

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. O. Braun-Falco

Der quantitative  
Candida-Albicans-Photo-Inhibitions-Test  
( CAPIT )  
Ein Verfahren zur In-vitro-Erfassung  
phototoxischer Substanzwirkungen

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Michael Halbing  
aus

Lindau

1988







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. O. Braun-Falco

Der quantitative  
Candida-Albicans-Photo-Inhibitions-Test  
( CAPIT )

Ein Verfahren zur In-vitro-Erfassung  
phototoxischer Substanzwirkungen

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Michael Halbing

aus  
Lindau

1988



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. B. Przybilla

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. h. c.  
O. Braun-Falco

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. U. Schwab

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.1988



|        |                                          |   |
|--------|------------------------------------------|---|
| 1.     | Meiner Frau Manuela                      | 2 |
| 2.     | und meinen Eltern                        | 3 |
| 3.     | General und Matrosen                     | 7 |
| 3.1.   | General - Matrosen                       | 7 |
| 3.2.   | Matrosen, Trossbegleiter und Kabinenfrau | 7 |
| 3.3.   | Matrosen (ca.)                           | 7 |
| 3.4.   | Matrosen (ca.)                           | 8 |
| 3.5.   | Matrosen                                 | 8 |
| 3.6.   | Matrosen (ca.)                           | 8 |
| 3.7.   | Matrosen                                 | 8 |
| 3.8.   | Matrosen                                 | 8 |
| 3.9.   | Matrosen                                 | 8 |
| 3.10.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.11.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.12.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.13.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.14.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.15.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.16.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.17.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.18.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.19.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.20.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.21.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.22.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.23.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.24.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.25.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.26.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.27.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.28.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.29.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.30.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.31.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.32.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.33.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.34.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.35.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.36.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.37.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.38.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.39.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.40.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.41.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.42.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.43.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.44.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.45.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.46.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.47.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.48.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.49.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.50.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.51.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.52.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.53.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.54.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.55.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.56.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.57.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.58.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.59.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.60.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.61.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.62.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.63.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.64.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.65.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.66.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.67.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.68.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.69.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.70.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.71.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.72.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.73.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.74.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.75.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.76.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.77.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.78.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.79.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.80.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.81.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.82.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.83.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.84.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.85.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.86.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.87.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.88.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.89.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.90.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.91.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.92.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.93.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.94.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.95.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.96.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.97.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.98.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.99.  | Matrosen                                 | 8 |
| 3.100. | Matrosen                                 | 8 |



| <u>Inhaltsverzeichnis</u>                         | Seite |
|---------------------------------------------------|-------|
| 1. Einleitung                                     | 3     |
| 2. Problemstellung                                | 6     |
| 3. Material und Methode                           | 7     |
| 3.1. Candida albicans                             | 7     |
| 3.2. Reagentien, Testsubstanzen und Nährmedium    | 7     |
| 3.2.1. Lösungsmittel                              | 7     |
| 3.2.2. Benoxapfen                                 | 8     |
| 3.2.3. Carprofen                                  | 8     |
| 3.2.4. Diclofenac-Na                              | 8     |
| 3.2.5. Ketoprofen                                 | 10    |
| 3.2.6. Tiaprofensäure                             | 10    |
| 3.2.7. Demeclocyclin                              | 10    |
| 3.2.8. 8-Methoxypsoralen                          | 11    |
| 3.2.9. Nährmedium                                 | 12    |
| 3.3. Geräte                                       | 12    |
| 3.3.1. Ultraschall und Coulter Counter            | 12    |
| 3.3.2. UV-Bestrahlung                             | 13    |
| 3.4. Verwendete Behältnisse                       | 17    |
| 3.5. Methode                                      | 17    |
| 3.5.1. Herstellen der Zellsuspension für den Test | 17    |
| 3.5.2. Ansatz zur Bestrahlung                     | 18    |
| 3.5.3. Abimpfen in Nährlösung                     | 19    |
| 3.5.4. Bestimmen der Zelldichten                  | 20    |
| 3.5.5. Quantitative Auswertung                    | 21    |
| 3.5.6. pH-Bereich                                 | 22    |

|        |                                                                                |    |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.     | Ergebnisse                                                                     | 23 |
| 4.1.   | Vorversuche                                                                    | 23 |
| 4.2.   | Wachstum bei Standardbedingungen                                               | 24 |
| 4.3.   | Wachstum nach alleiniger UV-Bestrahlung                                        | 25 |
| 4.4.   | Phototoxizitätstestungen                                                       | 27 |
| 4.4.1. | 8-Methoxypsoralen                                                              | 27 |
| 4.4.2. | Benoxaprofen                                                                   | 33 |
| 4.4.3. | Carprofen                                                                      | 36 |
| 4.4.4. | Diclofenac-Na                                                                  | 39 |
| 4.4.5. | Ketoprofen                                                                     | 42 |
| 4.4.6. | Tiaprofensäure                                                                 | 44 |
| 4.4.7. | Demeclocyclin                                                                  | 46 |
| 5.     | Diskussion                                                                     | 47 |
| 5.1.   | Der Candida-Albicans-Photo-Inhibitions-Test (CAPIT) mit flüssigem Nährmedium   | 47 |
| 5.2.   | 8-Methoxypsoralen                                                              | 52 |
| 5.2.1. | Testung von 8-Methoxypsoralen mit Candida albicans                             | 52 |
| 5.2.2. | Andere Modelle zur Erfassung der photo-toxischen Wirkung von 8-Methoxypsoralen | 58 |
| 5.3.   | Nichtsteroidale Antirheumatika                                                 | 60 |
| 6.     | Zusammenfassung                                                                | 69 |
| 7.     | Literaturverzeichnis                                                           | 72 |
| 8.     | Datenanhang                                                                    | 85 |
| 9.     | Danksagung                                                                     | 95 |
| 10.    | Lebenslauf                                                                     | 96 |

## 1. EINLEITUNG

Licht ist ein enger Bereich aus dem Spektrum der nicht-ionisierenden elektromagnetischen Strahlung. Neben den optisch sichtbaren Wellenlängen von 400-780 nm, werden im allgemeinen auch die ultraviolette Strahlung (UV-A: 320-400 nm, UV-B: 280-320 nm, UV-C: 200-280 nm) und das Infrarot (0,78-1000  $\mu\text{m}$ ) als Licht bezeichnet (69).

Bei jedem Individuum kann mit einer entsprechenden hochdosierten Lichtbestrahlung eine pathologische Reaktion der Haut ausgelöst werden. Am häufigsten ist der "Sonnenbrand", der als Reaktion auf Sonnenlicht oder auf dessen erythematogene Spektralbereiche auftritt. Die Zunahme von der normalen Lichtempfindlichkeit zur Lichtüberempfindlichkeit der Haut, die durch bestimmte endogene (z.B. Porphyrine) und exogene Stoffe (z.B. Medikamente) ausgelöst wird, bezeichnet man als Photosensibilisierung. Man unterscheidet bei diesen Hautreaktionen zwischen phototoxischen und photoallergischen Reaktionen. Die Phototoxizität tritt dabei häufiger in Erscheinung als die Photoallergie (12).

Es sind bereits viele Substanzen (Photosensibilisatoren) bekannt, die bei lokaler oder systemischer Anwendung zu einer Photosensibilisierung führen können. Diese Photosensibilisatoren findet man in den Reihen der Tetracycline, der Phenothiazine, der Sulfonamide, der Sulfonyl-Harnstoffverbindungen und der Diuretika vom Chlorothiazid-Typ. Auch eine Reihe anderer Substanzen zeigt photosensibilisierende Eigenschaften (15, 21, 28, 29, 48, 88, 89). Psoralene werden in der Photochemotherapie zur Behandlung der Psoriasis und anderer Dermatosen eingesetzt (76).

Bei einer Reihe von nichtsteroidalen Antirheumatika wurde inzwischen eine photosensibilisierende Wirkung beob-



achtet. Benoxaprofen (Coxigon<sup>R</sup>), das heute nicht mehr zur Therapie benutzt wird, war eine bekannte Ursache pathologischer Lichtreaktionen (2, 33, 42, 46, 50, 63, 71, 73, 115). Carprofen (Imadyl<sup>R</sup>) scheint nicht selten eine photosensibilisierende Wirkung auszuüben (7, 39, 52, 60, 77, 85, 90, 102). Auch bei Anwendung von Piroxicam (Felden<sup>R</sup>) wurde inzwischen mehrfach eine Photosensibilisierung beobachtet (3, 34, 104, 107). Bei einem mit Tiaprofensäure (Surgam<sup>R</sup>) behandelten Patienten wurde eine Dermatitis an lichtexponierten Hautpartien festgestellt. Daraufhin wurde die Phototoxizität dieser Substanz näher untersucht (100). Azetylsalizylsäure (Aspirin<sup>R</sup> u.a.), Ibuprofen (Brufen<sup>R</sup> u.a.), Indomethacin (Amuno<sup>R</sup> u.a.), Mefenaminsäure (Parkemed<sup>R</sup> u.a.), Naproxen (Apranax<sup>R</sup> u.a.), Oxyphenbutazon (Tanderil<sup>R</sup> u.a.) und Phenylbutazon (Butazolidin<sup>R</sup> u.a.) sind Antirheumatika, die nach einzelnen Beobachtungen eine pathologische Photoreaktion ausgelöst haben sollen. Damit stellt sich die Frage, ob die Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika nicht insgesamt als photosensibilisierend einzustufen ist (16, 72, 107). Man kann davon ausgehen, daß photoallergisierende Verbindungen grundsätzlich auch phototoxisch wirksam sind (28).

Um die phototoxische Wirkung von Substanzen beurteilen zu können, sind eine Reihe von Methoden beschrieben worden: Zum einen gibt es tierexperimentelle In-vivo-Tests an Mäusen (55, 56, 71, 81), an Meerschweinchen (24, 65, 99, 100, 108) und an Kaninchen (28). Hier besteht prinzipiell das Problem der Übertragbarkeit der Tierversuche auf den Menschen (28, 74, 79). Auf der anderen Seite gibt es In-vivo-Testverfahren am Menschen. Neben der epikutanen und der intrakutanen Applikation (4, 25, 57, 59, 62, 78, 87, 112) ist die kontrollierte klinische Studie von Bedeutung. Sie ist in

groß angelegtem Rahmen die einzige sichere Möglichkeit, die Fragen nach photosensibilisierenden Eigenschaften von Substanzen unter klinischen Anwendungsbedingungen zu beantworten.

Neben In-vitro-Testverfahren an Molekülen, die auf Photooxidierung von Aminosäuren oder Proteinen, phototoxischen Veränderungen an Nukleinsäuren und spektrometrischen Untersuchungen beruhen (6, 25, 53, 70), sind In-vitro-Testverfahren an menschlichen Zellen von Wichtigkeit (13, 14, 44, 67, 68, 86, 110, 116). Zur Erfassung der Photohämolyse werden menschliche Erythrozyten (8, 33, 70, 71) oder Hammelerythrozyten (103) verwendet. Ein weiteres Testverfahren ist der Photo-Basophilen-Histamin-Freisetzungs-Test, bei dem die phototoxisch induzierte Histaminausschüttung bestimmt wird (103). Auch nichtmenschliche Zellen werden zur Erfassung photosensibilisierender Eigenschaften herangezogen (35, 36). Neben *Paramecium* (5, 45, 114), *Trichophyton mentagrophytes* (51) und *Escherichia coli* (65) werden Hefen zur Testung kultiviert. Bei der Photo-toxizitätsbestimmung mit Hilfe von *Candida albicans* werden Gewebekulturschalen mit *Candida albicans* und mit der zu testenden Substanz beschickt und anschließend meist relativ lange und zum Teil auch mehrmals bestrahlt. Danach wird das Wachstum der Zellen beobachtet und mit entsprechenden Leerproben verglichen (23, 33, 56, 64, 70, 81, 83, 114). Dabei lassen sich auch morphologisch Veränderungen der Zellwände und der Organellen des Zytoplasmas nachweisen (101).

## 2. PROBLEMSTELLUNG

Mit den herkömmlichen Testverfahren zur Bestimmung phototoxischer Substanzwirkungen an *Candida albicans* wurde festgestellt, ob sich nach Einwirken von Testsubstanz und UV-Licht ein Zellwachstum einstellt oder nicht. Diese Testverfahren erfaßten also eine vollständige Wachstumshemmung von *Candida albicans* als phototoxischen Effekt einer Testsubstanz.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitere phototoxische Effekte von Testsubstanzen an *Candida albicans* zu bestimmen und der quantitativen Auswertung zuzuführen. Hierzu wurde das Wachstumsverhalten der Hefen herangezogen: Die Änderung des normalen Wachstums von *Candida albicans* nach Einwirken der zu testenden Substanz und nach Bestrahlung mit UV-Licht sollte erfaßt werden. Ein geeignetes Kulturverfahren, das eine regelmäßige quantitative Populationsanalyse ermöglicht, mußte hierfür gefunden werden. Die Populationsanalyse durfte die Hefenkulturen nicht beeinflussen und mußte exakt Auskunft geben können über den momentanen Stand der Zelldichte.

### 3. MATERIAL UND METHODE

#### 3.1. Candida albicans

Candida ist eine Gattung der Sproßpilze und umfaßt selbst wiederum zahlreiche Arten, von denen nur ein Teil für die medizinische Mykologie Bedeutung hat. Der wichtigste Vertreter ist Candida albicans (43, 49, 96).

Für die Versuche wurde ein einheitlicher Zellstamm verwendet. Es handelt sich um eine Subkultur von Candida albicans, die aus Untersuchungsmaterial eines Patienten gewonnen wurde.

#### 3.2. Reagentien, Testsubstanzen und Nährmedium

##### 3.2.1. Lösungsmittel

Azeton, Methanol, Essigsäure, jeweils in reinster Form, wurden von der Apotheke der klinischen Universitäts-Anstalten München bezogen. DMSO (Dimethylsulf-oxid) wurde von Merck (Darmstadt) geliefert. TCM-Puffer diente zur weiteren Verdünnung der Stammlösungen. Die Herstellung: 3,0 g Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Fluka, Buchs, Schweiz), 0,3 g KCl, 7,0 g NaCl, 0,147 g  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  in ca. 800 ml  $\text{H}_2\text{O}$  lösen (Magnetrührer), mit konzentrierter HCl auf pH 7,4 einstellen und auf 1000 ml auffüllen.

### 3.2.2. Benoxaprofen

Das nichtsteroidale Antirheumatikum Benoxaprofen wurde von Lilly (Bad Homburg) zur Verfügung gestellt.

Das Molekulargewicht beträgt 301,55. Zur Bereitung der Stammlösung wurden 90,48 mg in 1,0 ml Methanol gelöst und danach mit TCM-Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Die Endkonzentration betrug nach weiterer Verdünnung mit der Zellsuspension (1:6)  $10^{-3}$ M. Strukturformel siehe Abbildung 1.

### 3.2.3. Carprofen

Das nichtsteroidale Antirheumatikum Carprofen wurde von Hoffmann-La Roche (Grenzach-Wyhlen) zur Verfügung gestellt.

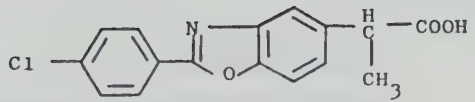
Das Molekulargewicht beträgt 273,72. Zur Bereitung der Stammlösung wurden 82,12 mg in 1,0 ml DMSO gelöst und danach mit TCM-Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Die Endkonzentration betrug nach weiterer Verdünnung mit der Zellsuspension (1:6)  $10^{-3}$ M. Strukturformel siehe Abbildung 1.

### 3.2.4. Diclofenac-Na

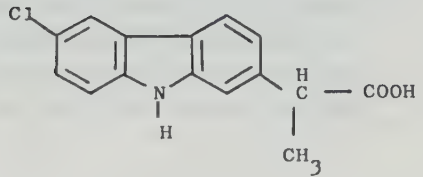
Das nichtsteroidale Antirheumatikum Diclofenac-Na wurde von Ciba-Geigy (Wehr) zur Verfügung gestellt.

Das Molekulargewicht beträgt 318,1. Zur Bereitung der Stammlösung wurden 95,43 mg in 1,0 ml Azeton gelöst und danach mit TCM-Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Die Endkonzentration betrug nach weiterer Verdünnung mit der Zellsuspension (1:6)  $10^{-3}$ M. Strukturformel siehe Abbildung 1.

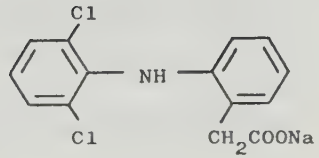
Benoxaprofen



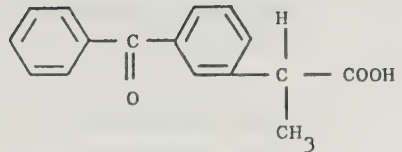
Carprofen



Diclofenac



Ketoprofen



Tiaprofensäure

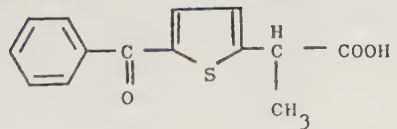


Abbildung 1: Strukturformeln von Benoxaprofen, Carprofen, Diclofenac, Ketoprofen und Tiaprofensäure.

### 3.2.5. Ketoprofen

Das nichtsteroidale Antirheumatikum Ketoprofen wurde von Bayer (Leverkusen) zur Verfügung gestellt.

Das Molekulargewicht beträgt 254,3. Zur Bereitung der Stammlösung wurden 76,29 mg in 1,0 ml Methanol gelöst und danach mit TCM-Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Die Endkonzentration betrug nach weiterer Verdünnung mit der Zellsuspension (1:6)  $10^{-3}$  M. Strukturformel siehe Abbildung 1.

### 3.2.6. Tiaprofensäure

Das nichtsteroidale Antirheumatikum Tiaprofensäure wurde von Albert-Roussel (Wiesbaden) zur Verfügung gestellt.

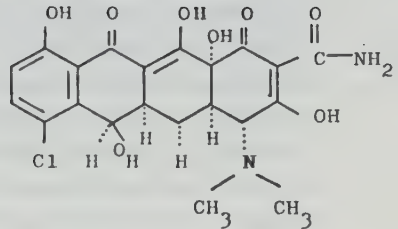
Das Molekulargewicht beträgt 260,3. Zur Bereitung der Stammlösung wurden 78,80 mg in 1,0 ml Methanol gelöst und danach mit TCM-Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Die Endkonzentration betrug nach weiterer Verdünnung mit der Zellsuspension (1:6)  $10^{-3}$  M. Strukturformel siehe Abbildung 1.

### 3.2.7. Demeclocyclin

Das Tetracyclin Demeclocyclin (Demethylchlortetracyclin, Ledermycin) wurde von Cyanamid (Wolfratshausen) zur Verfügung gestellt.

Das Molekulargewicht beträgt 464,88. Zur Bereitung der Stammlösung wurden 139,46 mg in 1,0 ml Azeton gelöst und danach mit TCM-Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Die Endkonzentration betrug nach weiterer Verdünnung mit der Zellsuspension (1:6)  $10^{-3}$  M. Strukturformel siehe Abbildung 2.

Demeclocyclin



8-Methoxypsoralen

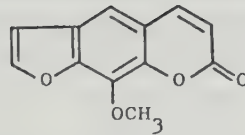


Abbildung 2: Strukturformeln von Demeclocyclin und 8-Methoxypsoralen.

### 3.2.8. 8-Methoxypsoralen

Das Psoralen 8-Methoxypsoralen wurde von Thomae (Biberach) zur Verfügung gestellt.

Das Molekulargewicht beträgt 216,18. Zur Bereitung der Stammlösung wurden 64,86 mg in 1,0 ml Essigsäure gelöst und danach mit TCM-Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Die Endkonzentrationen betrugen nach weiterer Verdünnung mit der Zellsuspension (1:6)  $10^{-3}$ M,  $10^{-4}$ M und  $5 \cdot 10^{-6}$ M. Strukturformel siehe Abbildung 2.

### 3.2.9. Nährmedium

Das für den Candida-Albicans-Photo-Inhibitions-Test verwendete Nährmedium wurde nach Kimmig ohne Agar hergestellt, war daher eine flüssige Nährlösung.

Die Zubereitung: 10 g Glukose, 5 g Pepton aus Fleisch, 5 g NaCl, 5 g Standard-II-Nährbouillion (Merck, Darmstadt) und 5 ml Glycerin auf 1000 ml mit Aqua dest auffüllen. Zusatz: 50 mg Chloramphenicol/l. Diesen Ansatz auf der Heizplatte mit Magnetrührer aufkochen und anschließend autoklavieren.

### 3.3. Geräte

#### 3.3.1. Ultraschall und Coulter Counter

Die in Kultur angetroffenen Zellverbände konnten vom Coulter Counter elektronisch nicht als Einzelzellen erfaßt werden. Daher wurden die Zellverbände in den Coulter-Counter-Reaktionsgefäßen mit Ultraschall (Labsonic 1510 mit Braunsonic 1510, Braun, Melsungen) bei 100 Watt in 12 Sekunden auseinandergerissen, bevor die Zellen gezählt wurden.

Mit der elektronischen Teilchenzählung von Coulter (Coulter Counter, Modell D 1, Coulter Electronics, Dunstable, Bedfordshire, England) können Teilchen in Flüssigkeit (Isotone Elektrolytlösung, Coulter Electronics) gezählt werden. Auch eine Bakterienzählung ist möglich (84).

Etwa 1,0 ml Suspension werden mittels Unterdruck durch eine Kapillare hindurchgetrieben und 0,5 ml werden zur Zählung verwendet. Zu beiden Seiten der Kapillare befinden sich Elektroden, zwischen denen der elektrische Widerstand gemessen wird. Passiert nun ein Teilchen die

Öffnung, ändert sich der Widerstand für kurze Zeit und wird als Impuls gezählt. Voraussetzung hierfür ist, daß sich das Teilchenvolumen in einem bestimmten Rahmen befindet, und daß die Konzentration der Teilchen in der Flüssigkeit nicht zu hoch ist. Die Größe der einzelnen runden bis ovalen *Candida albicans*-Zellen kann, wenn sich die Zellen in flüssigem Milieu befinden, mit Hilfe des Okular-Mikrometers am Mikroskop bestimmt werden (45). Nach Eichen und Messen kann man den Durchmesser berechnen, er beträgt zwischen 4  $\mu\text{m}$  und 9  $\mu\text{m}$ , bei extremen Bedingungen und je nach Alter der Zellen zwischen 3  $\mu\text{m}$  und 12  $\mu\text{m}$  (113). Daraus läßt sich, unter Annahme einer Kugelform, das ungefähre Volumen von 33,5 bis 382  $\mu\text{m}^3$  berechnen, um anschließend die untere Zählschwelle des Coulter Counter für *Candida albicans* einstellen zu können. In diesem Beispiel wird die Skalenanzeige auf "10" gestellt, dies entspricht einem Teilchenvolumen von 30  $\mu\text{m}^3$ . Es werden also sämtliche Zellen über der durch Einstellung des Schwellenwertes bestimmten Größenordnung gezählt.

### 3.3.2. UV-Bestrahlung

Zur UV-Bestrahlung wurden drei unterschiedliche Lichtquellen benutzt:

Ein Teil langwelliger UV-Bestrahlungen wurde mit UV-A-Leuchtstoffröhren (Sylvania FR90T/12/PUVA/HO in PUVA 4000 Photochemotherapy, Waldmann, Schwenningen) durchgeführt. Im Folgenden wird diese Strahlung als Schwarzlicht bezeichnet. Der Emissionsbereich liegt zwischen 300 und 400 nm, das Maximum um 350 nm. Das Gerät besitzt ein integriertes Intensitätsmessgerät, da sich die Strahlungsintensität mit der Betriebstemperatur und Brenndauer ändert. Die Intensität betrug bei 40 cm

Abstand nach 108 Sekunden  $1,0 \text{ J/cm}^2$ . Die verwendeten Intensitäten sind: 0,25 , 0,5 , 1,0 , 1,5 , 2,0 , 5,0 und  $10,0 \text{ J/cm}^2$ . Die Kurve der spektralen Verteilung ist in Abbildung 3 dargestellt.

Die übrigen langwelligen UV-Bestrahlungen wurden mit einem UV-B-freien UV-A-Hochintensitätsgerät (UVASUN<sup>R</sup> 5000, Mutzhas, München) durchgeführt. Im Folgenden wird diese Strahlung als UV-A bezeichnet. Der Emissionsbereich liegt zwischen 320 und 460 nm, das Maximum um 375 nm (82). Die Intensität betrug bei 40 cm Abstand nach 17 Sekunden  $1,0 \text{ J/cm}^2$ . Die verwendeten Intensitäten sind: 1 , 5 , 25 , 50 ,  $100 \text{ J/cm}^2$ . Die Kurve der spektralen Verteilung ist in Abbildung 3 dargestellt.

Die kurzwelligen UV-Bestrahlungen wurden mit Leuchtstoffröhren mit überwiegendem UV-B-Anteil (Philips TL 20W/12 in UV 800, Waldmann, Schwenningen) durchgeführt. Im Folgenden wird diese Strahlung als UV-B bezeichnet. Der Emissionsbereich liegt zwischen 275 und 365 nm, das Maximum um 315 nm. Der UV-B-Anteil verhält sich zum UV-A-Anteil wie 1,5:1. Die Intensität betrug bei 40 cm Abstand nach 110 Sekunden  $100 \text{ mJ/cm}^2$ . Die verwendeten Intensitäten sind: 100 , 200 , 500 ,  $1000 \text{ mJ/cm}^2$ . Die Kurve der spektralen Verteilung ist in Abbildung 4 dargestellt.

Die Strahlungsintensitäten von UV-A und UV-B wurden mit einem Messgerät mit getrennten Köpfen für UV-A und UV-B (Centra<sup>R</sup> UV-Messgerät, Osram, München) gemessen.

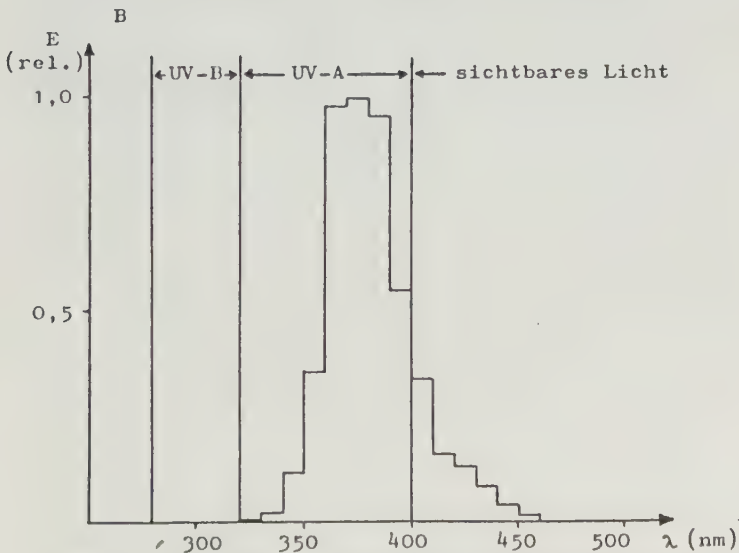
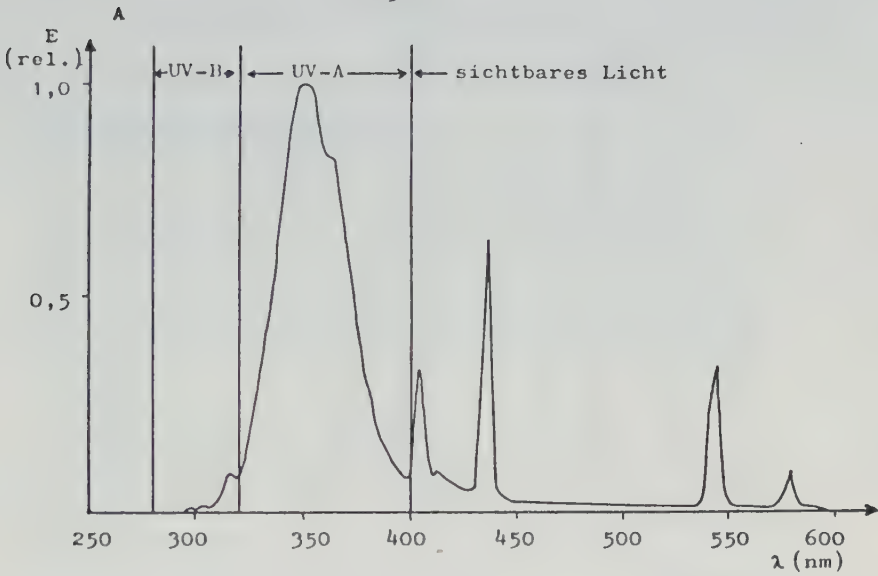


Abbildung 3: Spektrale Verteilung des Strahlungsflusses der Schwarzlicht- (A) und der UV-A-Bestrahlungen (B).

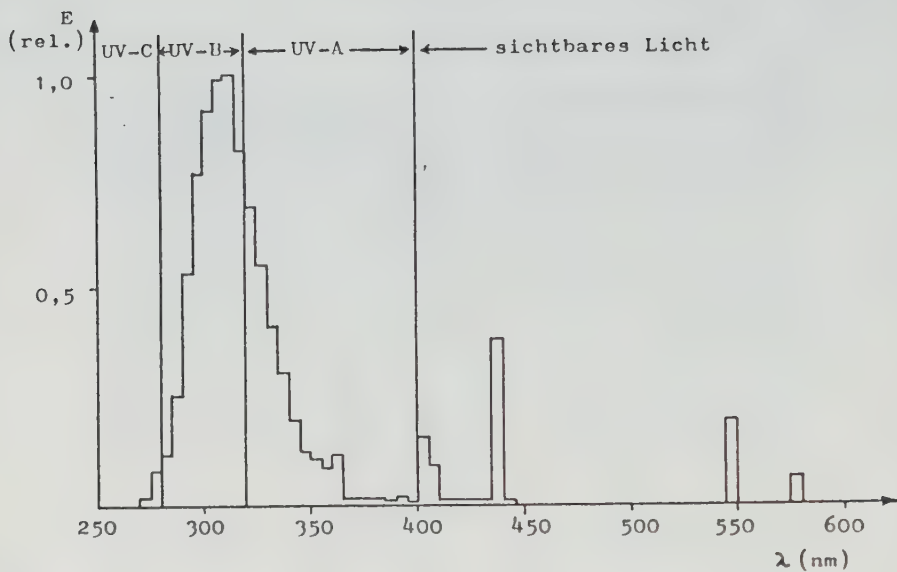


Abbildung 4: Spektrale Verteilung des Strahlungsflusses der UV-B-Bestrahlungen.

### 3.4. Verwendete Behältnisse

Die nur für Inkubation und Bestrahlung verwendeten "Gewebekulturschalen" waren sogenannte Makroplatten (Greiner, Nürtingen). Sie besitzen jeweils sechs Vertiefungen mit einem Durchmesser von 3,5 cm. Zu beachten ist, daß die Deckel während der UV-Bestrahlung abgenommen sind, da die Plastikdeckel vor UV-Einwirkung schützen (22).

Die verwendeten Zellkulturflaschen (Nunclo<sup>n</sup> 50 ml, Schräghals, Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden mit *Candida albicans*-Suspension und flüssiger Nährlösung beschickt und bei 37°C im dunklen Brutschrank geschüttelt. Diese Kulturflaschen wurden nicht fest verschlossen, da beim Hefewachstum Gase frei werden (113), die die geschlossenen Kunststoffflaschen sprengen würden.

### 3.5. Methode

#### 3.5.1. Herstellen der Zellsuspension für den Test

Die Subkultur aus dem Abstrich bildet schon nach 48 Stunden auf festem Nährboden rundliche, grauweiße, zuckergußartige Kolonien (111). Hiervon wurde eine Zellaufschwemmung hergestellt: In der Vorbereitung wurden kleine Glasgefäße etwa halb mit Aqua dest gefüllt, mit Gummistopfen und Sicherungsdeckel fest verschlossen und autoklaviert. Darauf wurden mit der Platinöse möglichst viele Zellen von der Subkultur in die autoklavierten Gefäße mit Aqua dest übergesetzt. Diese Zellaufschwemmung sollte milchig trübe, also konzentriert sein und wird anschließend gut verschlossen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Auf diese Weise können die Zellen längere Zeit in einer Art

Schlafstadium überleben (95). Man kann für die zeitlich auseinanderliegenden Versuche immer wieder auf den gleichen Zellstamm zurückgreifen, ohne neue Subkulturen herzustellen. Benötigt man für einen Test eine Zellkultur, sticht man mit einer Kanüle durch den Gummistopfen der Zellaufschwemmungsflasche und aspiriert eine kleine Menge vom Volumen. Diese Stammzellen werden in flüssiges Nährmedium gegeben und bei 37°C geschüttelt. Schon nach ein paar Tagen ist eine deutlich milchige Trübung der sonst klaren Nährlösung sichtbar, und ein typischer Hefegeruch wahrnehmbar. Je mehr Zellen gewünscht sind, desto mehr Nährlösung und mehr Zeit wird benötigt.

Um Nährlösung und Zellen zu trennen wurde für 10 Minuten bei 1200 U/Min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit Aqua dest aufgeschwemmt. Zum Waschen wurde der gleiche Vorgang noch zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen mit Aqua dest aufgeschwemmt, bis eine Zellkonzentration von ca. 1 Million Zellen/ml erreicht war. Die Kontrolle erfolgte mit dem Coulter Counter. Diese mäßig trübe Suspension hat sich für den Testansatz als geeignete Ausgangskonzentration erwiesen.

### 3.5.2. Ansatz zur Bestrahlung

Nach Beschriftung der Makroplatten (3.4.) wurden zuerst jeweils 200 µl der Lösung der Testsubstanzen bzw. Leerproben (Lösungsmittel und TCM-Puffer ohne Testsubstanz) in die vorgesehenen Vertiefungen pipettiert und darauf gab man in einem zügigen Durchgang jeweils 1000 µl der nach Punkt 3.5.1. hergestellten Zellsuspension. Für diesen Arbeitsschritt ist zu beachten, daß einzelne Substanzen schon durch Tageslicht im Labor ihre phototoxische Wirkung auf *Candida albicans*

ausüben können. Daher pipettiert man zügig bei möglichst wenig Licht und deckt anschließend die Ansätze ab. Mit dieser Ansatzmenge von 1200  $\mu$ l ist der Boden der Makroplatten jeweils gut bedeckt und es entsteht die Verdünnung 1:6, die für die Stimulanzkonzentration von 1 mM nötig ist. Die Platten, die nicht bestrahlt werden sollten, wurden mit Aluminiumfolie eingepackt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 30 Minuten wurden die UV-Bestrahlungen durchgeführt.

### 3.5.3. Abimpfen in Nährlösung

Nach erfolgter UV-Bestrahlung wurden die Zellen, die sich in Flüssigkeit langsam am Boden absetzen, durch kleine Kreisbewegungen aufgeschüttelt. Aus dem Gesamtvolumen von je 1200  $\mu$ l wurden nur jeweils 500  $\mu$ l entnommen, da es nicht möglich war, aus der relativ großflächigen Vertiefung das gesamte Volumen restlos abzuheben. So wurden von den rund 1 Millionen bestrahlten Zellen nur rund 400 000 Zellen aus der Vertiefung weiterverwendet. Zu bedenken ist, daß sich die Zellen, zum Teil im Zellverband, an der oft auch etwas rauen Plastikvertiefung abgesetzt haben, und sich durch die Mischbewegungen nicht vollständig vom Untergrund abheben lassen. Eine rechnerische Erfassung der Zellzahl im Ansatz ist daher nur größenordnungsmäßig möglich: Da die jeweils 500  $\mu$ l Zellsuspension in die Zellkulturflaschen gegeben und anschließend mit 20 ml autoklavierter Nährlösung in Kulturmilieu gebracht wurden, waren rund 400 000 Zellen in 20,5 ml Nährlösung enthalten. Dies entspricht einer Zelldichte von rund 20 000 Zellen pro ml. Von dem vermischten Inhalt der Flaschen wurden nun 1000  $\mu$ l zum Zählen mit dem Coulter Counter in die entsprechenden Zählgefäße abpipettiert.

Darauf wurde mit 10,0 ml isotoner Elektrolytlösung verdünnt und nach Ultraschall-Anwendung im Coulter Counter gezählt. So erhielt man die erste Zählung, die die Ausgangswerte für die verschiedenen Zellkulturen ergab.

#### 3.5.4. Bestimmen der Zelldichten

Der Coulter Counter kann maximal 99 999 Zellen pro 0,5 ml zählen. Die zu bestimmenden Zellsuspensionen müssen hierzu mit isotonem Elektrolyt auf entsprechend niedrige Konzentrationen eingestellt werden. An Hand der unterschiedlichen Trübung läßt sich mit etwas Übung die Größenordnung der Ausgangskonzentration abschätzen. Die entsprechenden verwendeten Verdünnungen betragen: 50-1000  $\mu$ l Zellsuspension plus 10 oder 15 ml Isotone. Diese Verdünnungsschritte müssen beim Auswerten der Zählergebnisse berücksichtigt werden. Zuvor wird jedes einzelne Zählergebnis mit Hilfe der Koinzidenzberichtigungstabellen von Coulter Counter berichtigt. Diese Tabellen berücksichtigen die Wahrscheinlichkeit, daß mehrere Teilchen gleichzeitig die Kapillare des Coulter Counter passieren und daher nur ein Impuls gezählt wird. Die Bestimmung der Zelldichte einzelner Kulturen wurde nach Überimpfen der Zellen in die flüssige Nährlösung täglich ein- bis zweimal durchgeführt, bis sich eine Zellpopulation, deren Dichte sich nicht mehr erhöhte, eingestellt hat. Die Zeitpunkte, an denen die Zelldichte bestimmt wurde, waren meist nach ca. 1, 19, 27, 43, 51 und 68 Stunden. Genaue Angaben hierüber sind im Datenanhang zu finden. Nach drei bis vier Tagen ließ sich meist ein leichter Abfall der Zelldichte aufzeigen.

### 3.5.5. Quantitative Auswertung

Grundlage der quantitativen Auswertung waren die ermittelten Zelldichten an den jeweiligen Zeitpunkten. Da die Zeitpunkte der Populationsanalysen mehrere Stunden auseinanderlagen, ließen sich Wachstumsbeginn und -ende und damit auch die Wachstumsgeschwindigkeit nicht exakt bestimmen, zumal es sich um ein exponentielles Wachstum handelt. So wurden die maximal erreichbaren Zelldichten zur quantitativen Auswertung herangezogen.

Die Leerwerte setzten sich aus je zwei Einzelwerten zusammen: Der erste Wert ergab sich aus der reinen Substanzwirkung der Testsubstanz auf das *Candida albicans*-Wachstum nach Inkubation ohne UV-Bestrahlung. Der zweite Wert ergab sich aus der Wirkung der UV-Bestrahlung auf das *Candida albicans*-Wachstum ohne Testsubstanzeinwirkung. Die ermittelten maximal erreichbaren Zelldichten der Testansätze wurden denen der bestrahlten Leerwerte gegenübergestellt:

$$\frac{\text{max. Zelldichte (Testansatz)} \cdot 100}{\text{max. Zelldichte (Leerwert)}} = \%$$

So wurde der prozentuale Anteil der Testansätze von den bestrahlten Leerwerten berechnet. Anschließend wurde die Substanzwirkung ohne Bestrahlung abgezogen. Die Hemmung gibt an, um wieviel Prozent die maximal erreichbare Zelldichte des Testansatzes unter der des Leerwertes lag. Stellte sich im Testansatz kein Wachstum ein, war eine 100%ige Hemmung des *Candida albicans*-Wachstums erreicht.

### 2.5.6. pH-Bereich

Die pH-Werte der Zellsuspensionen lagen je nach Lösungsmittel der verwendeten Testsubstanzen zwischen pH 3,3 (Essigsäure in TCM-Puffer mit Zellen in Aqua dest) und pH 7,1 (TCM-Puffer mit Zellen in Aqua dest). Sie änderten sich während der Bestrahlung nur geringfügig, und lagen nach Zugabe des flüssigen Nährmediums zwischen pH 4,5 und pH 6,9. *Candida albicans* wächst über einen sehr großen pH-Bereich gut, das Optimum liegt zwischen pH 5,1 und pH 6,4 (113). Da die pH-Werte stark unterschiedlich waren und um die Wirkung von Lösungsmitteln auszuschalten, wurde für jede verwendete Testsubstanz als Leerwert die entsprechende substanzfreie Lösungsmittelkonzentration in TCM-Puffer benutzt.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Vorversuche

In den Vorversuchen wurden die bekannten Tests zum Nachweis von phototoxischen Substanzwirkungen an *Candida albicans* auf Agar-Platten schrittweise verändert:

Zunächst wurden *Candida albicans*-Zellen in wässriger Suspension ohne Nährmedium zur UV-A-Bestrahlung gebracht und anschließend auf festen Nährboden übergesetzt.

Im nächsten Schritt wurden die belichteten Zellen nicht mehr auf festem Nährboden, sondern in flüssiger Nährlösung in Kulturmilieu gebracht. Die anschließende unmittelbare Zählung der Hefezellen unter dem Mikroskop erwies sich als außerordentlich zeitaufwendig. Mit dem photometrischen Trübungsmeßverfahren konnte das Erfassen der Zellpopulation zwar vereinfacht und beschleunigt werden, aber die Ergebnisse waren durch die unterschiedlichen Zellgrößen, wegen der Streuung des Lichtes durch die Zellsuspension und wegen der Möglichkeit des in diesem Verfahren zu falschen Ergebnissen führenden Bakterienbefalls einzelner Testansätze zu ungenau.

Das Ergebnis dieser Vorversuche ist der unter "Material und Methode" beschriebene quantitative *Candida-Albicans*-Photo-Inhibitions-Test (CAPIT). Die Reproduzierbarkeit von CAPIT wurde in einem Versuch, in dem jeweils fünf gleiche Ansätze ( $10^{-3}$ M Carprofen) mit 0, 1, 5, 25 J/cm<sup>2</sup> UV-A bestrahlt wurden, getestet. Die Zählergebnisse sind im Datenanhang zu finden. Der Vergleich der Ansätze, die mit 25 J/cm<sup>2</sup> UV-A

bestrahlt wurden, ergab während des Wachstums die größten Schwankungen ( $\pm 35\%$ ). Bei  $5 \text{ J/cm}^2$  UV-A-Bestrahlung betrugen die Unterschiede während der Wachstumsperiode  $\pm 26\%$ , bei  $1 \text{ J/cm}^2$  UV-A-Bestrahlung und auch in den unbestrahlten Proben  $\pm 5\%$ . Nachdem sich in allen Ansätzen das Niveau der maximalen Zelldichte nach der Wachstumsperiode eingestellt hatte, waren auch nach einer Bestrahlung mit  $25 \text{ J/cm}^2$  UV-A die Schwankungen nicht größer als  $\pm 3$  bis  $5\%$ . Es wurden nur die Werte der maximalen Zelldichten nach den Wachstumsphasen der Ansätze den quantitativen Testauswertungen zugeführt.

Die nachfolgenden Ergebnisse beruhen fast alle auf einfachen Testansätzen. Die Zählergebnisse, wie sie im Datenanhang zu finden sind, stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen mit dem Coulter Counter dar.

#### 4.2. Wachstum bei Standardbedingungen

*Candida albicans* zeigt unter normalen Bedingungen (Nährlösung nach Kimmig,  $37^\circ\text{C}$ , bei Dunkelheit geschüttelt) einen exponentiellen Anstieg der Zelldichte, bis sich nach einiger Zeit die Wachstumsgeschwindigkeit verringert und schließlich einstellt. Es entsteht eine Zelldichte, die sich je nach den gegebenen Bedingungen, z.B. Konzentration der Nährlösung, in unterschiedlicher Höhe befindet. Wir sprechen von maximaler Zelldichte der Zellpopulation. Befanden sich die Zellen zu Beginn z.B. in Aqua dest (mit den unterschiedlichen Lösungsmitteln, wie sie für die Tests verwendet wurden) und brachte man sie darauf in Nährlösung, so änderte sich das Wachstumsschema als solches nicht.

Den typischen, normalen Wachstumsverlauf zeigt die Kurve a der Abbildung 5: Zu Beginn ist ein äußerst steiler Verlauf feststellbar (man beachte die logarithmische Ordinate). Schon nach 27 Stunden war die maximale Zelldichte erreicht.

#### 4.3. Wachstum nach alleiniger UV-Bestrahlung

Durch äußere Einflüsse kann sich der Beginn des *Candida albicans*-Wachstums verzögern, die Geschwindigkeit der Vermehrung und die maximal erreichbare Zelldichte ändern. Die Hefen sind zwar gegen äußere Einflüsse relativ unempfindlich, wie die einfache Kultivierbarkeit zeigt (113), konnten aber durch UV-Licht beeinflusst werden: Die Wachstumsgeschwindigkeit wurde mit steigender Intensität und kürzerer Wellenlänge zunehmend gebremst, das sich daraufhin einstellende Niveau wurde über einen weiten Intensitätsbereich nur wenig vermindert.

In der Abbildung 5 stellt die Kurve a das Wachstum der unbestrahlten Zellkultur dar. Dieser Ansatz war bei der Bestrahlung mit Aluminiumfolie abgedeckt und unterlag ansonsten den gleichen Versuchsdurchführungen. Ein Temperatureffekt der Bestrahlung kann dadurch ausgeschlossen werden. Die Kurve b zeigt die Vermehrung von Hefen nach  $100 \text{ J/cm}^2$  UV-A-Belichtung. Die Steilheit während der Vermehrungsperiode ist geringer als die der Kurve a. Die maximale Zelldichte erreichte 85% des unbestrahlten Ansatzes. Die Hemmung, ausgelöst mit  $100 \text{ J/cm}^2$  UV-A, betrug 15%. Die Kurve c gibt den Wachstumsverlauf von Hefen nach  $1000 \text{ mJ/cm}^2$  UV-B-Belichtung wieder. In den ersten 17 Stunden war kein Wachstum feststellbar. Es lag ein verzögerter Wachstumsbeginn vor. Zwi-

Zellen  
pro ml

- 26 -

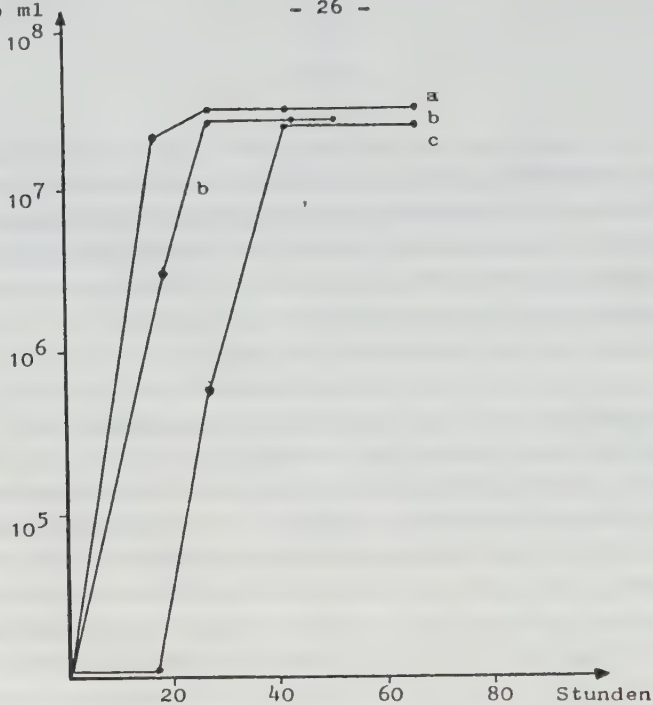


Abbildung 5: Wachstum von *Candida albicans*:

- a) Ohne UV-Bestrahlung
- b) 100 J/cm² UV-A
- c) 1000 mJ/cm² UV-B

schen 17 und 27 Stunden befand sich der Beginn der Zellvermehrung. Die Steilheit der Kurve und damit die Geschwindigkeit der Vermehrung ist ähnlich der der Kurve b. Entsprechend der anfänglichen Verzögerung stellte sich die maximale Zelldichte relativ spät ein. Sie lag etwas unter der maximalen Zelldichte des mit 100 J/cm² UV-A bestrahlten Ansatzes. Die Hemmung der maximalen Zelldichte betrug hier 20%.

#### 4.4. Phototoxizitätstestungen

##### 4.4.1. 8-Methoxypsoralen

8-Methoxypsoralen, wie es in Verbindung mit Schwarzlicht zur Psoriasistherapie verwendet wird (12, 76), zeigte folgende Wirkung:

Bei einer 8-Methoxypsoralenkonzentration von  $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  ( $1,0 \mu\text{g/ml}$ ) war bei einer Bestrahlungsintensität von  $0,5 \text{ J/cm}^2$  Schwarzlicht eine nur gering beeinträchtigte Wachstumsgeschwindigkeit von *Candida albicans* gegenüber dem Leerwert festzustellen. Die Hemmung nach Erreichen der maximalen Zelldichten betrug 5%. Nach Bestrahlen mit  $1,0 \text{ J/cm}^2$  Schwarzlicht war die Wachstumsgeschwindigkeit ähnlich schwach gebremst wie nach  $0,5 \text{ J/cm}^2$ . Die Hemmung betrug 6%. Nach  $2,0 \text{ J/cm}^2$  Schwarzlicht resultierte eine Hemmung von 10%. Wurde die Bestrahlungsintensität auf bis zu  $10 \text{ J/cm}^2$  Schwarzlicht erhöht, verzögerte sich der Wachstumsbeginn geringfügig, die Zellvermehrung schritt langsamer voran und die sich einstellende maximale Zelldichte lag um bis zu 21% unter der des entsprechenden Leerwertes. Erhöhte man die 8-Methoxypsoralenkonzentration auf  $10^{-4} \text{ M}$ , wurde die phototoxische Wirkung deutlicher: Nach  $0,5 \text{ J/cm}^2$  Schwarzlicht war die Wachstumsgeschwindigkeit von *Candida albicans* reduziert, und es stellte sich eine maximale Zelldichte ein, die 81% vom Leerwert erreicht hat. Dies entsprach einer Hemmung von 19%. Bestrahlte man den Ansatz mit  $2,0 \text{ J/cm}^2$  Schwarzlicht, stellte sich nach verzögertem Wachstum eine maximale Zelldichte ein, die 80% von dem entsprechenden Leerwert erreicht hat. Die Hemmung betrug 20%. Die höchste verwendete 8-Methoxypsoralenkonzentration betrug  $10^{-3} \text{ M}$ . Mit ihr wurde die stärkste phototoxische Wirkung erreicht: Schon nach Bestrahlung mit  $0,25 \text{ J/cm}^2$

Schwarzlicht zeigte sich ein verzögertes Wachstum des *Candida albicans*-Testansatzes. Die sich einstellende maximale Zelldichte lag um 29% unter der des entsprechenden Leerwertes. In der Abbildung 6 ist die Wachstumskurve des Leerwertes nach Bestrahlung mit  $5 \text{ J/cm}^2$  Schwarzlicht als Kurve a dargestellt. Die beiden Testansätze mit 8-Methoxypsoralen ( $10^{-3}\text{M}$ ) sind als Kurve b (nach  $1,0 \text{ J/cm}^2$ ) und Kurve c (nach  $5,0 \text{ J/cm}^2$  Schwarzlicht) bezeichnet. Die Wachstumsgeschwindigkeit des Ansatzes nach  $1,0 \text{ J/cm}^2$  Schwarzlicht (Kurve b) war niedriger als die des Leerwertes. Die sich daraufhin einstellende maximale Zelldichte erreichte 76 % des entsprechenden Leerwertes. Eine Hemmung von 24 % war erreicht. Nach  $5,0 \text{ J/cm}^2$  Schwarzlicht in Verbindung mit 8-Methoxypsoralen (Kurve c) war das Wachstum deutlich langsamer. Die sich darauf einstellende maximale Zelldichte lag bei 62 % vom Leerwert, entsprechend einer Hemmung von 38 %. Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über die gefundenen Hemmwerte mit 8-Methoxypsoralen und Schwarzlicht.

Die Kombination von 8-Methoxypsoralen ( $10^{-3}\text{M}$ ) mit UV-A-Bestrahlung lieferte folgende Ergebnisse: In der Abbildung 7 sind neben der Wachstumskurve für den Leerwert nach Bestrahlung mit  $25 \text{ J/cm}^2$  UV-A (Kurve a) drei Testansätze herausgestellt:

Das Wachstumsverhalten von *Candida albicans* mit 8-Methoxypsoralen ( $10^{-3}\text{M}$ ) nach Bestrahlung mit  $1,0 \text{ J/cm}^2$  UV-A (Kurve b). Die Wachstumsgeschwindigkeit war verzögert, die maximale Zelldichte lag um 45 % unter der des entsprechenden Leerwertes.

Die Wachstumskurve c nach Bestrahlung mit  $25 \text{ J/cm}^2$  UV-A: Hier lag die Vermehrungsgeschwindigkeit von *Candida albicans* etwas unter der des schwächer bestrahlten Ansatzes. Die sich einstellende maximale Zelldichte war höher,

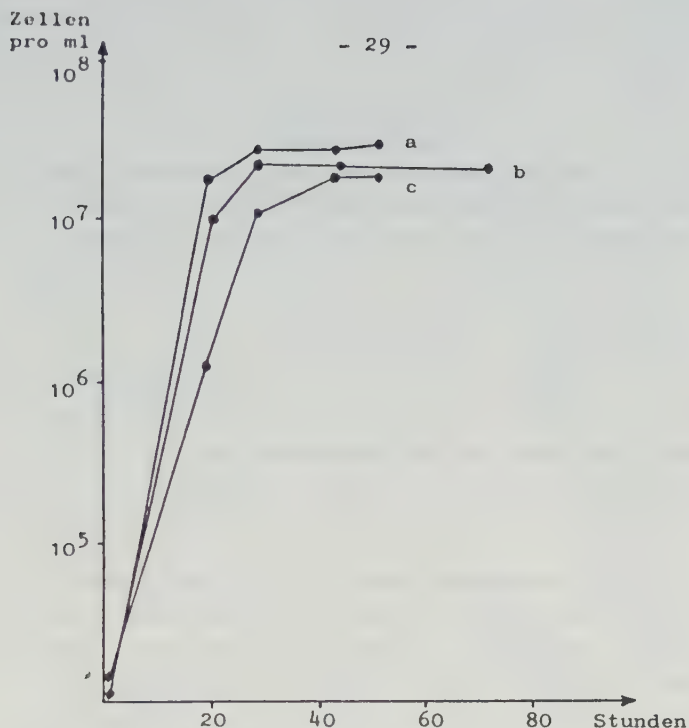


Abbildung 6: Wachstum von *Candida albicans* nach Schwarzlicht-Bestrahlung in Anwesenheit von 8-Methoxypsoralen (8-MOP, 10<sup>-3</sup>M):

- a) Leerwert, 5 J/cm<sup>2</sup>
- b) 8-MOP, 1 J/cm<sup>2</sup>
- c) 8-MOP, 5 J/cm<sup>2</sup>

| I                               | 0,25 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | 5,0 | 10 | (J/cm <sup>2</sup> ) |
|---------------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|----|----------------------|
| 8-MOP<br>5 · 10 <sup>-6</sup> M | 0    | 5   | 6   | 19  | 10  | 6   | 21 | (%)                  |
| 8-MOP<br>10 <sup>-4</sup> M     | 11   | 19  | 11  | 7   | 20  | -   | -  | (%)                  |
| 8-MOP<br>10 <sup>-3</sup> M     | 29   | 31  | 24  | 17  | 6   | 38  | 25 | (%)                  |

Tabelle 1': CAPIT-Hemmwerte (%) mit 8-Methoxypsoralen (8-MOP) bei Schwarzlicht-Intensität (I)

Zellen  
pro ml

- 30 -

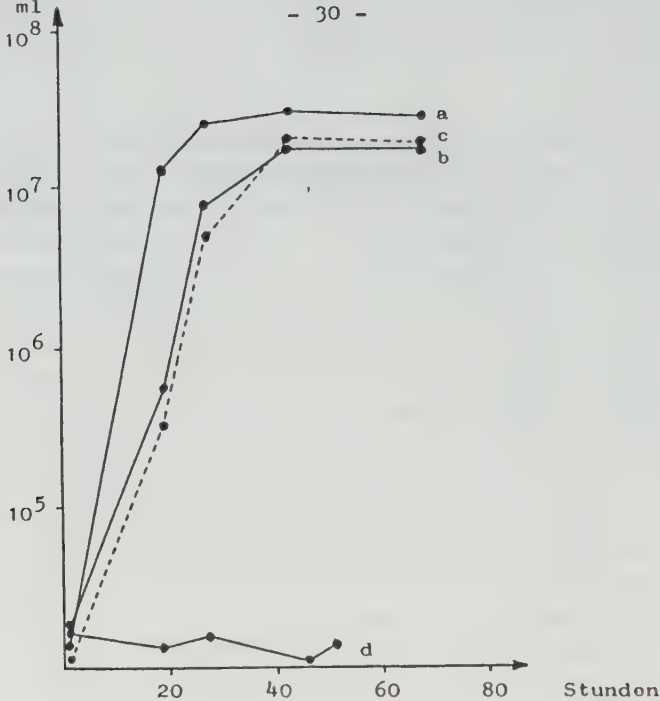


Abbildung 7: Wachstum von *Candida albicans* nach UV-A-Bestrahlung in Anwesenheit von 8-Methoxypsoralen (8-MOP,  $10^{-3}$ M):

- a) Leerwert,  $25 \text{ J/cm}^2$
- b) 8-MOP (Inkubation 0,5 Std.),  $1 \text{ J/cm}^2$
- c) 8-MOP (Inkubation 0,5 Std.),  $25 \text{ J/cm}^2$
- d) 8-MOP (Inkubation 2,5 Std.),  $25 \text{ J/cm}^2$

entsprechend einer Hemmung von 33 %.

Der Testansatz d unterschied sich vom Ansatz c nur in der Inkubationszeit von 8-Methoxypsoralen vor der Bestrahlung: Während bei allen anderen Testansätzen 0,5 Stunden inkubiert wurde, lag hier bei Ansatz d diese Einwirkzeit bei 2,5 Stunden. Es wurde über 51 Stunden

kein Wachstum von *Candida albicans* beobachtet (100 %ige Hemmung). Tabelle 2 gibt einen Überblick über die CAPIT-Hemmwerte mit 8-Methoxypsoralen und UV-A-Bestrahlung.

| I                           | 1  | 5  | 25 | 50 | 100 | (J/cm <sup>2</sup> ) |
|-----------------------------|----|----|----|----|-----|----------------------|
| 8-MOP<br>10 <sup>-3</sup> M | 45 | 44 | 33 | 34 | 14  | (%)                  |

Tabelle 2: CAPIT-Hemmwerte (%) mit 8-Methoxypsoralen (8-MOP, 10<sup>-3</sup>M) bei UV-A-Intensität (I)

Bestrahlte man die mit 8-Methoxypsoralen (10<sup>-3</sup>M) inkubierten Ansätze mit UV-B, so erhielt man folgende Ergebnisse: Nach Belichtung mit 100 mJ/cm<sup>2</sup> UV-B war die Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zum entsprechenden Leerwert nicht reduziert, die sich einstellende maximale Zelldichte erreichte 86 % vom Leerwert. Die Abbildung 8 zeigt die Kurven des Leerwertes nach 1000 mJ/cm<sup>2</sup> UV-B (Kurve a), des Testansatzes nach 500 mJ/cm<sup>2</sup> UV-B (Kurve b), und des Testansatzes nach 1000 mJ/cm<sup>2</sup> UV-B (Kurve c). Die Vermehrungsgeschwindigkeit nach 500 mJ/cm<sup>2</sup> UV-B (Kurve b) lag deutlich unter der des Leerwertes, die maximale Zelldichte erreichte 17 % vom Leerwert. Dies entsprach einer Hemmung von 83 %. Wurde die Bestrahlungsdosis auf 1000 mJ/cm<sup>2</sup> UV-B erhöht (Kurve c), resultierte daraus ein noch langsames *Candida albicans*-Wachstum, die maximale Zelldichte erreichte 3 % des Leerwertes, entsprechend einer 97 %igen Hemmung (Tabelle 3).

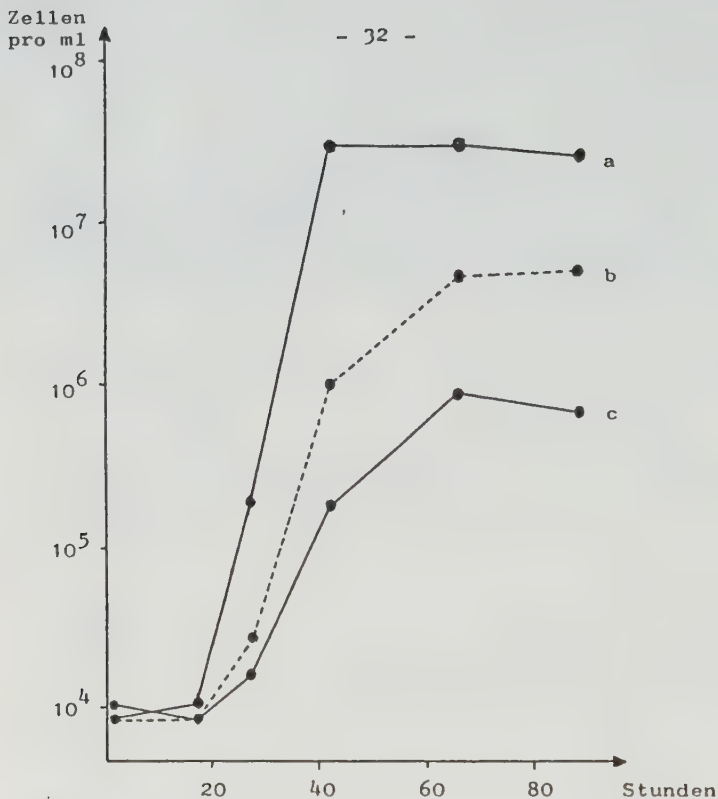


Abbildung 8: Wachstum von *Candida albicans* nach UV-B-Bestrahlung in Anwesenheit von 8-Methoxypsoralen (8-MOP,  $10^{-3}\text{M}$ ):

- a) Leerwert, 1000 mJ/cm<sup>2</sup>
- b) 8-MOP, 500 mJ/cm<sup>2</sup>
- c) 8-MOP, 1000 mJ/cm<sup>2</sup>

|                             |     |     |      |                       |
|-----------------------------|-----|-----|------|-----------------------|
| I                           | 100 | 500 | 1000 | (mJ/cm <sup>2</sup> ) |
| 8-MOP<br>10 <sup>-3</sup> M | 14  | 83  | 97   | (%)                   |

Tabelle 3: CAPIT-Hemmwerte (%) mit 8-Methoxypsoralen (8-MOP,  $10^{-3}\text{M}$ ) bei UV-B-Intensität (I)

#### 4.4.2. Benoxaprofen

Die Testung von Benoxaprofen wurde mit einer Konzentration von  $10^{-3}\text{M}$  durchgeführt. Dabei resultierte nach Bestrahlung mit  $5,0 \text{ J/cm}^2$  UV-A ein schwach beeinträchtigtcs Wachstumsverhalten von *Candida albicans*. Die maximal erreichbare Zelldichte betrug 90 % vom Leerwert. Nach Belichtung mit  $25 \text{ J/cm}^2$  UV-A stellte sich eine Zelldichte ein, die 85 % des Leerwertes erreicht hat. Die Vermehrungsgeschwindigkeit nach  $50 \text{ J/cm}^2$  UV-A war geringer als nach  $25 \text{ J/cm}^2$ , die resultierende Hemmung basierend auf der Zelldichte war mit 16 % nur gering höher. In der Abbildung 9 ist das Wachstum von *Candida albicans* nach  $100 \text{ J/cm}^2$  UV-A-Bestrahlung dargestellt. Die Kurve a gibt den Leerwert wieder. Die Kurve b zeigt das Wachstum des Testansatzes mit Benoxaprofen ( $10^{-3}\text{M}$ ) auf: Die Vermehrungsgeschwindigkeit war reduziert und die maximale Zelldichte erreichte 67 % vom Leerwert (Tabelle 4). Wurden *Candida albicans*-Zellen mit Benoxaprofen inkubiert und mit UV-B bestrahlt, ergab sich nach  $100 \text{ mJ/cm}^2$  UV-B eine Hemmung von 17 %. In der Abbildung 10 steht die Kurve a für den Leerwert, die Kurve b für den Testansatz mit Benoxaprofen ( $10^{-3}\text{M}$ ), jeweils nach Belichtung mit  $500 \text{ mJ/cm}^2$  UV-B. Der Wachstumsbeginn des Ansatzes a war verzögert. Die Steilheit der Kurve a ist größer als die der Kurve b. Der Testansatz b erreichte nicht die Zelldichte, wie sie vom Leerwert erreicht wurde. Es ergab sich eine Hemmung von 24 % (Tabelle 5).

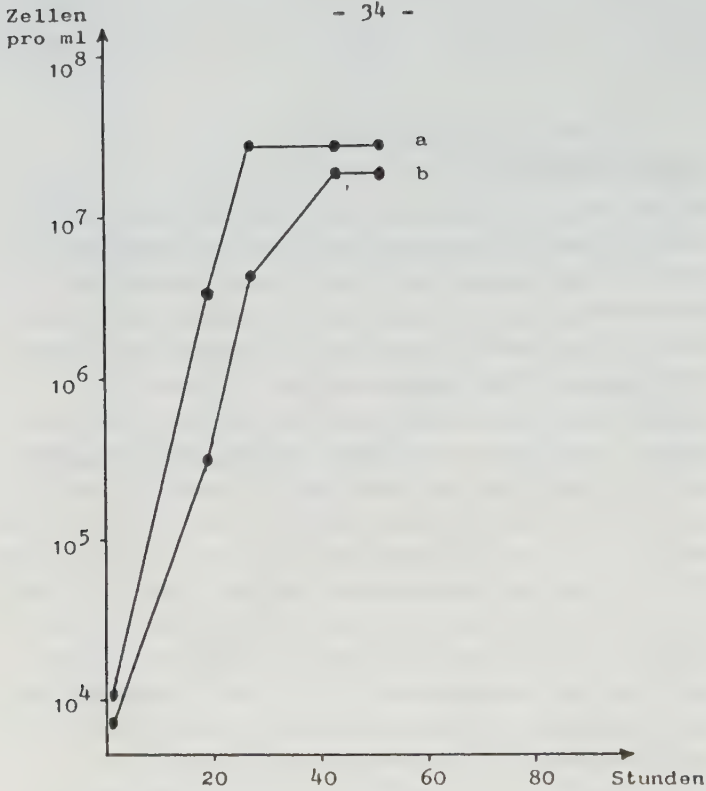


Abbildung 9: Wachstum von *Candida albicans* nach UV-A-Bestrahlung in Anwesenheit von Benoxaprofen ( $10^{-3}M$ ):

a) Leerwert, 100 J/cm<sup>2</sup>

b) Benoxaprofen, 100 J/cm<sup>2</sup>

|     |   |    |    |    |     |                      |
|-----|---|----|----|----|-----|----------------------|
| I   | 1 | 5  | 25 | 50 | 100 | (J/cm <sup>2</sup> ) |
| BXP | 0 | 10 | 15 | 16 | 33  | (%)                  |

Tabelle 4: CAPIT-Hemmwerte (%) mit Benoxaprofen (BXP,  $10^{-3}M$ ) bei UV-A-Intensität (I)

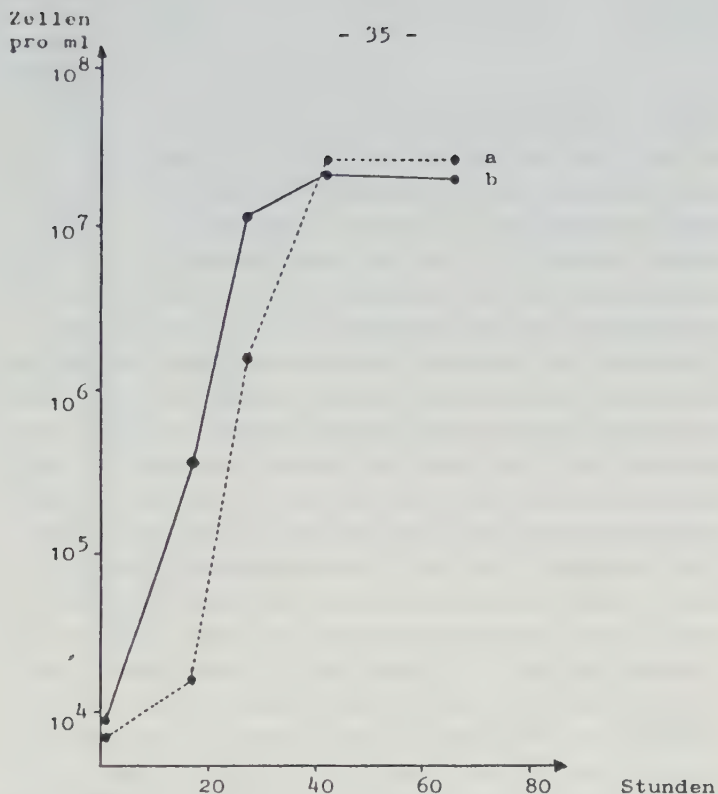


Abbildung 10: Wachstum von *Candida albicans* nach UV-B-Bestrahlung in Anwesenheit von Benoxaprofen ( $10^{-3}M$ ):

a) Leerwert,  $500 \text{ mJ/cm}^2$

b) Benoxaprofen,  $500 \text{ mJ/cm}^2$

|     |     |     |      |                      |
|-----|-----|-----|------|----------------------|
| I   | 100 | 500 | 1000 | ( $\text{mJ/cm}^2$ ) |
| BXP | 17  | 24  | 14   | (%)                  |

Tabelle 5: CAPIT-Hemmwerte (%) mit Benoxaprofen (BXP,  $10^{-3}M$ ) bei UV-B-Intensität (I)

#### 4.4.3. Carprofen

Bei der Phototoxizitätstestung mit Carprofen ( $10^{-3}M$ ) wurde nach  $5,0 \text{ J/cm}^2$  UV-A-Bestrahlung ein leicht verzögertes Wachstum festgestellt. Die maximale Zelldichte betrug 80 % vom Leerwert. Erhöhte man die Bestrahlungsdosis auf  $25 \text{ J/cm}^2$  UV-A (Kurve b in der Abbildung 11), war der Wachstumsbeginn stärker beeinträchtigt, die sich am Wachstumsende einstellende Zelldichte lag bei 89 % vom entsprechenden Leerwert. Dies entsprach einer Hemmung von 11 %. Nach  $50 \text{ J/cm}^2$  UV-A-Bestrahlung ließ sich über einen Zeitraum von über 70 Stunden kein Wachstum feststellen (Kurve c), eine 100%ige Hemmung war erreicht. Ein Carprofen-Testansatz wurde mit  $100 \text{ J/cm}^2$  UV-A bestrahlt. Hier konnte man eine deutliche Verzögerung des Wachstumsbeginns beobachten. Es wurden 81 % vom Leerwert erreicht, die Hemmung war mit 19 % niedriger als nach Bestrahlung mit  $50 \text{ J/cm}^2$  UV-A. Hierbei ist an eine mögliche Zerstörung des Carprofenmoleküls durch die hohe UV-A-Intensität zu denken. Tabelle 6 gibt einen Überblick.

Bei Phototoxizitätstestung mit Carprofen ( $10^{-3}M$ ) nach UV-B-Bestrahlung (Abbildung 12) erhielt man nach  $100 \text{ mJ/cm}^2$  UV-B (Kurve b) einen kurz verzögerten Wachstumsbeginn, und nach normaler Vermehrungsperiode eine Zelldichte, die 76 % des Leerwertes erreicht hat. Dies entsprach einer Hemmung von 24 %. Nach Belichtung mit  $500 \text{ mJ/cm}^2$  UV-B (Kurve c) war der Beginn des Zellwachstums ebenfalls verzögert, die anschließende Vermehrungsgeschwindigkeit war kleiner, und die maximale Zelldichte erreichte 57 % vom Leerwert. Die Hemmung betrug 43 %. Nach  $1000 \text{ mJ/cm}^2$  UV-B war beim Leerwert wie auch beim Testansatz ein späterer Wachstumsbeginn und eine reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit feststellbar. Der Testansatz erreichte 87 % vom Leerwert (Tabelle 7).

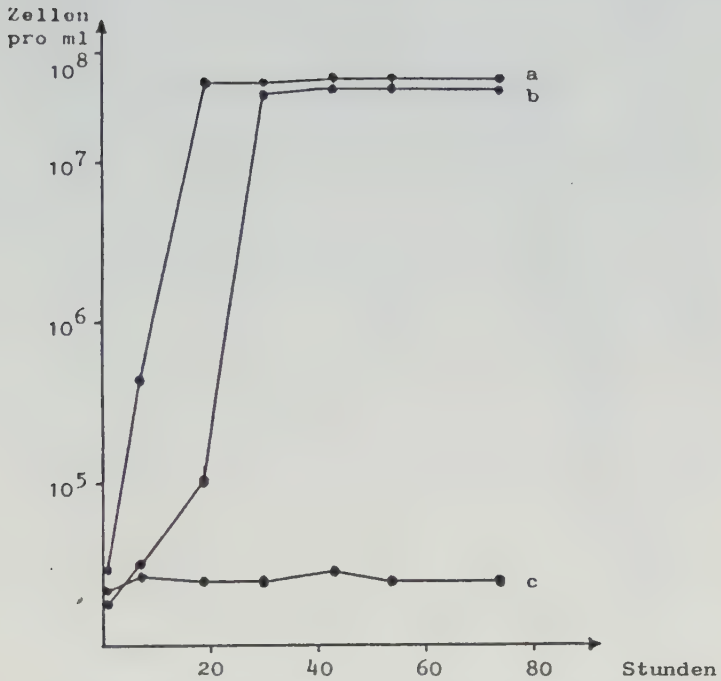


Abbildung 11: Wachstum von *Candida albicans* nach UV-A-Bestrahlung in Anwesenheit von Carprofen (CPF,  $10^{-3}\text{M}$ ):

a) Leerwert,  $25 \text{ J/cm}^2$

b) CPF,  $25 \text{ J/cm}^2$

c) CPF,  $50 \text{ J/cm}^2$

|     |   |    |    |     |     |                     |
|-----|---|----|----|-----|-----|---------------------|
| I   | 1 | 5  | 25 | 50  | 100 | ( $\text{J/cm}^2$ ) |
| CPF | 0 | 20 | 11 | 100 | 19  | (%)                 |

Tabelle 6: CAPIT-Heminwerte (%) mit Carprofen (CPF,  $10^{-3}\text{M}$ ) bei UV-A-Intensität (I)

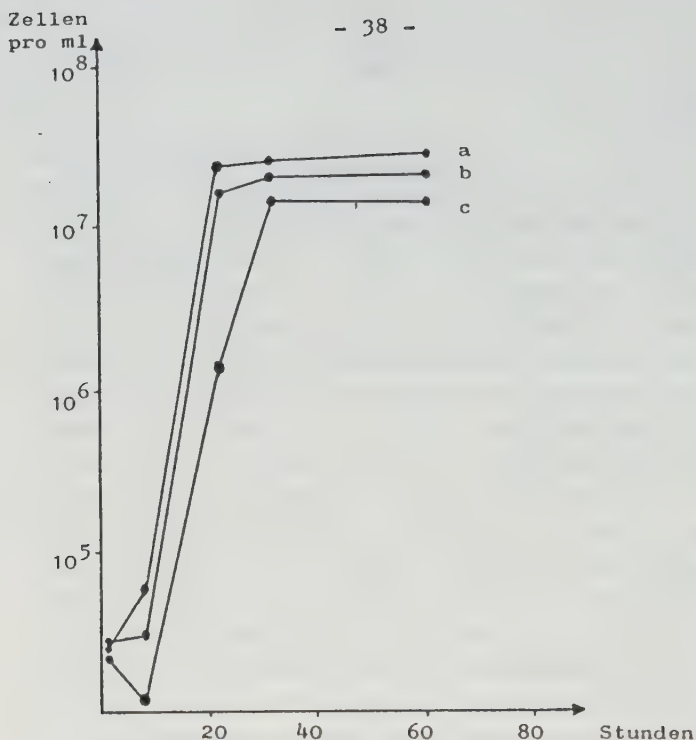


Abbildung 12: Wachstum von *Candida albicans* nach UV-B-Bestrahlung in Anwesenheit von Carprofen (CPF,  $10^{-3}\text{M}$ ):

- a) Leerwert,  $100 \text{ mJ/cm}^2$
- b) CPF,  $100 \text{ mJ/cm}^2$
- c) CPF,  $500 \text{ mJ/cm}^2$

|     |     |     |      |                      |
|-----|-----|-----|------|----------------------|
| I   | 100 | 500 | 1000 | ( $\text{mJ/cm}^2$ ) |
| CPF | 24  | 43  | 13   | (%)                  |

Tabelle 7: CAPIT-Hemmwerte (%) mit Carprofen (CPF,  $10^{-3}\text{M}$ ) bei UV-B-Intensität (I)

#### 4.4.4. Diclofenac-Na

Die Testung von Diclofenac-Na ( $10^{-3}M$ ) erbrachte folgende Ergebnisse: Nach Bestrahlung der Testansätze mit 1,0 , 5,0 , 25 J/cm<sup>2</sup> UV-A zeigten sich keine deutlichen Veränderungen des Candida albicans-Wachstums. Nach Bestrahlung mit 50 J/cm<sup>2</sup> UV-A zeigte sich eine Beeinträchtigung in der Vermehrungsperiode von Candida albicans. Die maximale Zelldichte erreichte 80 % vom Leerwert. In der Abbildung 13 sind die beiden Wachstumsverläufe nach 100 J/cm<sup>2</sup> UV-A dargestellt. Der Testansatz (Kurve b) vermehrte sich langsamer als der Leerwert (Kurve a) und erreichte schließlich 80 % des Leerwertes (20 % Hemmung). In Tabelle 8 sind die Hemmwerte zusammengestellt. Andere Ergebnisse lieferte die Bestrahlung mit UV-B: Nach 100 mJ/cm<sup>2</sup> UV-B war keine phototoxische Wirkung nachweisbar. In der Abbildung 14 ist die Kurve a der Leerwert nach 500 mJ/cm<sup>2</sup> UV-B-Bestrahlung, die Kurve b zeigt das veränderte Wachstum des Testansatzes nach Bestrahlung mit 500 mJ/cm<sup>2</sup> UV-B. Die Wachstumsgeschwindigkeit war reduziert, die maximale Zelldichte stellte sich daher später ein und erreichte 33 % vom Leerwert, entsprechend einer Hemmung von 67 %. Die Kurve c verdeutlicht, daß sich nach 1000 mJ/cm<sup>2</sup> UV-B in Verbindung mit Diclofenac-Na kein Wachstum von Candida albicans eingestellt hat. Eine 100%ige Hemmung war erreicht (Tabelle 9).

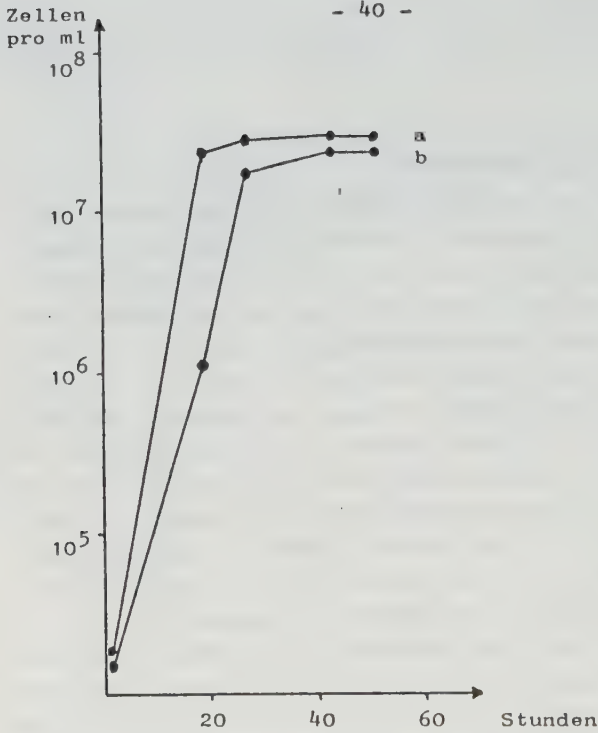


Abbildung 13: Wachstum von *Candida albicans* nach UV-A-Bestrahlung in Anwesenheit von Diclofenac-Na ( $10^{-3}\text{M}$ ):  
a) Leervert,  $100 \text{ J/cm}^2$   
b) Diclofenac-Na,  $100 \text{ J/cm}^2$

|     |   |   |    |    |     |                      |
|-----|---|---|----|----|-----|----------------------|
| I   | 1 | 5 | 25 | 50 | 100 | (J/cm <sup>2</sup> ) |
| DCF | 4 | 4 | -4 | 20 | 20  | (%)                  |

Tabelle 8: CAPIT-Hemmwerte (%) mit Diclofenac-Na (DCF,  $10^{-3}\text{M}$ ) bei UV-A-Intensität (I)

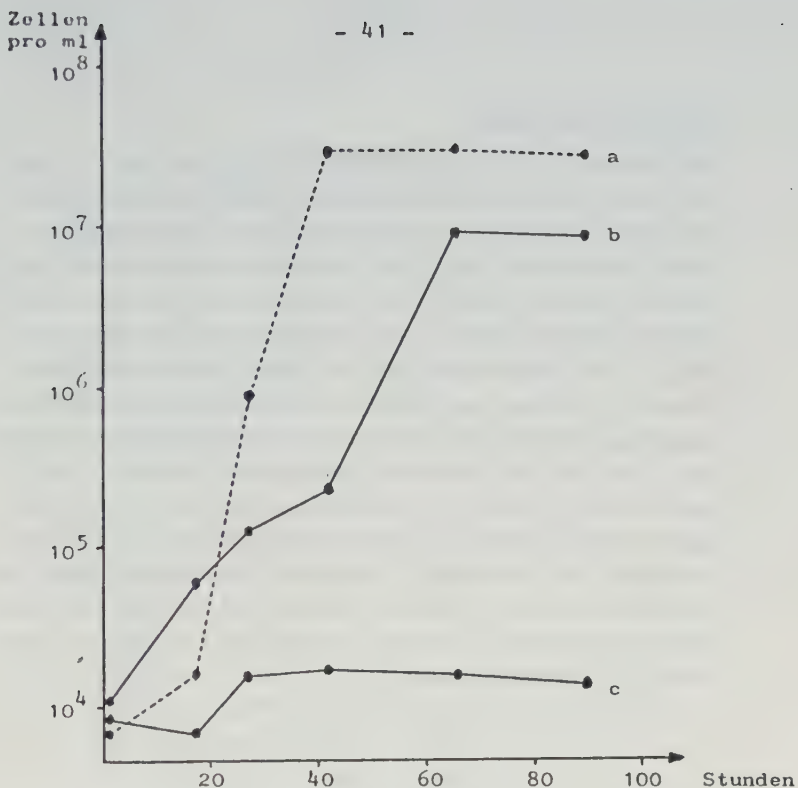


Abbildung 14: Wachstum von *Candida albicans* nach UV-B-Bestrahlung in Anwesenheit von Diclofenac-Na (DCF,  $10^{-3}\text{M}$ ):

- a) Leerwert,  $500 \text{ mJ/cm}^2$
- b) DCF,  $500 \text{ mJ/cm}^2$
- c) DCF,  $1000 \text{ mJ/cm}^2$

|     |     |     |      |                       |
|-----|-----|-----|------|-----------------------|
| I   | 100 | 500 | 1000 | (mJ/cm <sup>2</sup> ) |
| DCF | 17  | 67  | 100  | (%)                   |

Tabelle 9: CAPIT-Hemmwerte (%) mit Diclofenac-Na (DCF,  $10^{-3}\text{M}$ ) bei UV-B-Intensität (I)

#### 4.4.5. Ketoprofen

Die phototoxische Wirkung von Ketoprofen ( $10^{-3}M$ ) war im UV-A-Bereich sehr ausgeprägt: Nach Bestrahlung mit  $5,0 J/cm^2$  UV-A war die Wachstumsgeschwindigkeit nur wenig vermindert, die sich einstellende maximale Zelldichte erreichte 91 % vom Leerwert. Die Ergebnisse für  $25$  und  $50 J/cm^2$  UV-A sind in der Abbildung 15 aufgezeigt: Der Testansatz nach  $25 J/cm^2$  UV-A-Bestrahlung (Kurve b) zeigte in den ersten 20 Stunden kein Wachstum. Die sich anschließende Vermehrungsgeschwindigkeit war hoch und die maximale Zelldichte erreichte 89 % vom Leerwert (Kurve a). Die Hemmung betrug 11 %. Die Kurve c steht für den Testansatz nach  $50 J/cm^2$  UV-A-Bestrahlung. Sie zeigt, daß über 54 Stunden lang kein *Candida albicans*-Wachstum eingesetzt hat. Es war eine 100%ige Hemmung erreicht. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

|     |   |    |     |     |              |
|-----|---|----|-----|-----|--------------|
| I   | 5 | 25 | 50  | 100 | ( $J/cm^2$ ) |
| KPF | 9 | 11 | 100 | 100 | (%)          |

Tabelle 10: CAPIT-Hemmwerte (%) mit Ketoprofen (KPF,  $10^{-3}M$ ) bei UV-A-Intensität (I)

Im UV-B-Bereich war bis  $1000 mJ/cm^2$  UV-B-Bestrahlung keine nennenswerte phototoxische Wirkung von Ketoprofen ( $10^{-3}M$ ) zu beobachten (Tabelle 11).

|     |     |     |      |               |
|-----|-----|-----|------|---------------|
| I   | 100 | 500 | 1000 | ( $mJ/cm^2$ ) |
| KPF | 9   | -5  | 1    | (%)           |

Tabelle 11: CAPIT-Hemmwerte (%) mit Ketoprofen (KPF,  $10^{-3}M$ ) bei UV-B-Intensität (I)

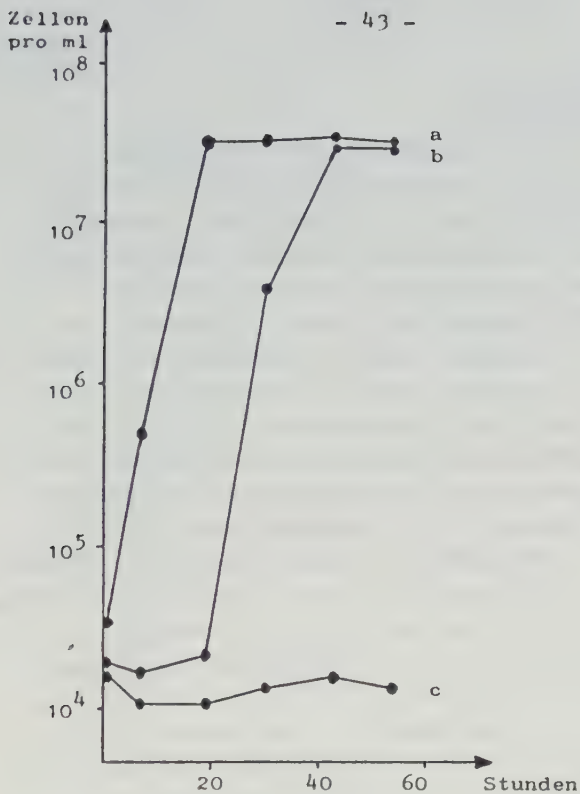


Abbildung 15: Wachstum von *Candida albicans* nach UV-A-Bestrahlung in Anwesenheit von Keto-  
 profen (KPF,  $10^{-3}\text{M}$ ):  
 a) Leerwert,  $25 \text{ J/cm}^2$   
 b) KPF,  $25 \text{ J/cm}^2$   
 c) KPF,  $50 \text{ J/cm}^2$

#### 4.4.6. Tiaprofensäure

Wurde der mit Tiaprofensäure ( $10^{-3}M$ ) inkubierte Ansatz mit  $1,0 \text{ J/cm}^2$  UV-A bestrahlt, so erreichte dessen maximale Zelldichte 87 % vom Leerwert. Die Ergebnisse der mit höheren Intensitäten bestrahlten Testansätze sind in Abbildung 16 wiedergegeben. Nach  $5,0 \text{ J/cm}^2$  UV-A-Bestrahlung (Kurve b) stellte sich die maximale Zelldichte bei 75 % vom entsprechenden Leerwert ein (Hemmung: 25 %). Die Kurve c stellt den Wachstumsverlauf nach Bestrahlung mit  $25 \text{ J/cm}^2$  UV-A dar. Die Vermehrungsgeschwindigkeit war geringer und die sich einstellende Zelldichte erreichte 53 % vom Leerwert (Hemmung: 47 %). Wurde die Bestrahlungsdosis auf  $50 \text{ J/cm}^2$  UV-A erhöht, so ließ sich über 51 Stunden kein Wachstum feststellen (Kurve d). Es war eine 100%ige Hemmung erreicht. Eine Erhöhung der Bestrahlungsdosis auf  $100 \text{ J/cm}^2$  UV-A erbrachte ebenfalls eine vollständige Hemmung (Tabelle 12).

Die UV-B-Bestrahlung lieferte andere Ergebnisse: Nach  $500 \text{ mJ/cm}^2$  UV-B-Bestrahlung setzte das Wachstum des Testansatzes etwas früher ein, die sich ergebende maximale Zelldichte erreichte 95 % vom Leerwert. Wurde mit  $1000 \text{ mJ/cm}^2$  UV-B bestrahlt, vermehrten sich die *Candida albicans*-Zellen des Testansatzes etwas schneller als die des Leerwertes. Die maximale Zelldichte lag bei 85 % des Leerwertes. Die Hemmwerte sind in Tabelle 13 dargestellt.

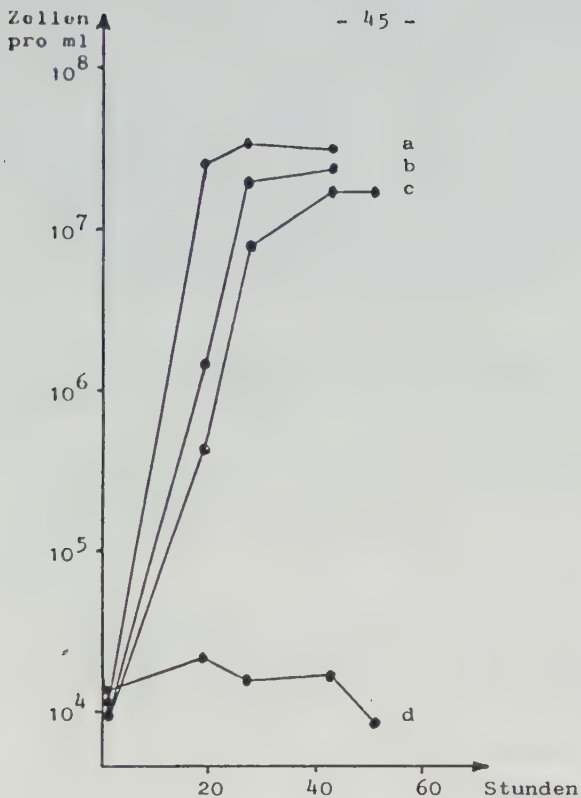


Abbildung 16: Wachstum von *Candida albicans* nach UV-A-Bestrahlung in Anwesenheit von Tiapropensäure (TPA,  $10^{-3}M$ ):

- a) Leerwert,  $25 J/cm^2$
- b) TPA,  $5 J/cm^2$
- c) TPA,  $25 J/cm^2$
- d) TPA,  $50 J/cm^2$

|     |    |    |    |     |     |                      |
|-----|----|----|----|-----|-----|----------------------|
| I   | 1  | 5  | 25 | 50  | 100 | (J/cm <sup>2</sup> ) |
| TPA | 13 | 25 | 47 | 100 | 100 | (%)                  |

Tabelle 12: CAPIT-Hemmwerte (%) mit Tiaprofensäure  
(TPA, 10<sup>-3</sup>M) bei UV-A-Intensität (I)

|     |     |     |      |                       |
|-----|-----|-----|------|-----------------------|
| I   | 100 | 500 | 1000 | (mJ/cm <sup>2</sup> ) |
| TPA | 5   | 5   | 15   | (%)                   |

Tabelle 13: CAPIT-Hemmwerte (%) mit Tiaprofensäure  
(TPA, 10<sup>-3</sup>M) bei UV-B-Intensität (I)

#### 4.4.7. Demeclocyclin

Weder mit UV-A noch mit UV-B-Bestrahlung konnte eine phototoxische Wirkung von Demeclocyclin (10<sup>-3</sup>M) nachgewiesen werden. Auch in anderen In-vitro-Testverfahren mit *Candida albicans* wirkte Demeclocyclin nicht phototoxisch (23, 56). Eine Negativkontrolle war somit gegeben.

## 5. DISKUSSION

### 5.1. Der Candida-Albicans-Photo-Inhibitions-Test (CAPIT) mit flüssigem Nährmedium

Alle bekannten Phototoxizitätstestungen an *Candida albicans* sind Verfahren, die das Wachstum der Zellen auf festem Agar-Nährboden verfolgen (23, 33, 56, 64, 70, 71, 81, 83, 114). Grundlage ist hierbei die Methode von Daniels (23): Er verteilte eine *Candida albicans*-Suspension auf Sabouraud-Agar, gab die Testsubstanz in Reinform hinzu und bestrahlte mit Schwarzlicht. Eine klare Zone um die Testsubstanz, die sich ohne Bestrahlung nicht ergab, ließ auf eine phototoxische Wirkung der Testsubstanz schließen. Diese Testdurchführung wurde mehrfach variiert und verfeinert. So wurde neben Sabouraud-Agar, Agar nach Kimmig und Nervina-Agar verwendet. Die Testsubstanzen wurden gelöst und in verschiedenen Konzentrationen meist auf kleine Filterpapierscheiben aufgetragen. Diese Scheiben wurden auf den mit *Candida albicans* beschickten Nährboden gelegt. Über die anschließende UV-Bestrahlung wurde oft wenig ausgesagt. Teils wurde eine Inkubationszeit vor der UV-Bestrahlung beschrieben, teils wurde in Intervallen mehrmals bestrahlt, teils fand das gesamte Wachstum unter ständiger UV-Bestrahlung statt. Genaue Aussagen über die verwendeten UV-Intensitäten und spektralen Zusammensetzungen der verwendeten Lichtquellen wurden selten gemacht. Die Auswertung beruht auf Ausmessen der Hemmzonen oder Auszählen einzelner Zellkolonien. Hierbei sind genauere Auskünfte über das Ausmaß der Beeinflussung des normalen Hefezellwachstums und damit der

phototoxischen Wirkung der getesteten Substanz nicht möglich. In der Tabelle 14 sind Nährmedium, Inkubationszeit und Bestrahlungsdauer oder -intensität einzelner Testmodelle verglichen. Nur der Candida-Albicans-Photo-Inhibitions-Test (CAPIT) arbeitet mit flüssigem Nährmedium.

|                               | Nährmedium                       | Inkubationszeit<br>vor Bestrahlung | Bestrahlung                      |
|-------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| Daniels<br>(23)               | fest (Sabou-<br>raud-Agar)       | keine                              | gesamte Wach-<br>tumsdauer       |
| Ison, Davis<br>(56)           | fest (Sabou-<br>raud-Agar)       | keine                              | 18-20 h (ges.<br>Wachstumsdauer) |
| Knudsen<br>(64)               | fest (Sabou-<br>raud-Agar)       | keine                              | 1-16 J/cm <sup>2</sup>           |
| Ljunggren<br>(70)             | fest (Sabou-<br>raud-Agar)       | keine                              | 57,6 J/cm <sup>2</sup><br>(16 h) |
| Oberste-Lehn,<br>Plempel (83) | fest (Ner-<br>vina-Agar)         | 18 h                               | 2,86 J/cm <sup>2</sup>           |
| Wiskemann<br>(114)            | fest (Kim-<br>mig-Agar)          | 4 h                                | 4 h                              |
| CAPIT                         | flüssig<br>(Kimmig ohne<br>Agar) | 0,5 h                              | 0,25-100 J/cm <sup>2</sup>       |

Tabelle 14: Überblick über unterschiedliche Methoden mit *Candida albicans* zur Erfassung photo-toxischer Substanzwirkung

Der in der vorliegenden Arbeit beschriebene CAPIT unterscheidet sich von den übrigen bekannten Methoden. Er ist nicht nur klar definiert, sondern weicht von

den anderen Testmethoden ab: Die mit der Testsubstanz inkubierten *Candida albicans*-Zellen werden nach erfolgter UV-Bestrahlung in ein flüssiges Nährmedium übergesetzt und so in Kulturmilieu gebracht. Das Wachstum beginnt erst jetzt. Die Testsubstanzkonzentration wird durch die Nährlösung erniedrigt, bei den anderen Verfahren bleibt sie erhalten. Die Zelldichten werden elektronisch erfaßt und können quantitativ ausgewertet werden. Man vergleicht verschiedene Ansätze in ihrer Zelldichte und schließt daraus auf die Wirkung der zu testenden Substanzen. Zeigt sich in den ersten Stunden, nachdem die Hefen in Nährlösung gebracht wurden, kein Wachstum, läßt sich daraus schließen, daß der Stoffwechsel, der für die Vermehrung der Zellen notwendig ist, darnieder liegt. Regenerieren die Zellen, so kann sich eine normale Wachstumsgeschwindigkeit und Zellvermehrung einstellen. Wir bezeichnen dies als verzögerten Wachstumsbeginn. Auslöser für den verzögerten Wachstumsbeginn kann UV-Licht alleine, oder aber auch UV-Licht in Verbindung mit einer Testsubstanz sein. Auch bei Dermatophyten wurde eine Wachstumshemmung, die durch UV-Licht alleine ausgelöst wurde, beschrieben (17, 18). Andererseits ist es möglich, daß sich während der Testdauer kein Wachstum der Hefen mehr einstellt. Diese 100%ige Hemmung des Hefezellwachstums beruht auf der phototoxischen Wirkung der Testsubstanz in Verbindung mit UV-Bestrahlung. Eine fungizide Wirkung kann angenommen werden. Die Geschwindigkeit der normalen Zellvermehrung ist zu Beginn sehr hoch. Dies entspricht einer anfangs sehr steilen Wachstumskurve bei frischer Nährlösung. Die Konzentrationen der Substrate, die für die Stoffwechselvorgänge nötig sind, sind also zu Beginn im Nährmedium optimal hoch. Wird das Nährmedium während

des Wachstums durch den Zellstoffwechsel zusehends verbraucht, sinkt durch diese Substratkonzentrationsabnahme und durch die Zunahme von Stoffwechselendprodukten die Wachstumsgeschwindigkeit. Bei angenommener optimaler Substratkonzentration könnte eine verminderte Wachstumsgeschwindigkeit als Folge einer nichtkompetitiven Enzymhemmung oder gemischten Enzymhemmung gedeutet werden (58). Es wurden aber auch Schäden der Zellmembran und anderer Zellbestandteile beobachtet, die ebenfalls die Wachstumsgeschwindigkeit erniedrigen können (101). Schließlich endet die Wachstumsphase, und es stellt sich im Medium eine bestimmte Zelldichte ein. Diese maximale Zelldichte ist in ihrer Höhe von den Zellen selbst, aber auch von den Bedingungen, die sie beeinträchtigen können, abhängig.

Im Test waren die verwendeten Zellen alle von einem Stamm und wurden gleich behandelt. Die substanzfreien Leerwertansätze wurden genauso wie die Testansätze mit den entsprechenden Lösungsmitteln der Testsubstanzen versetzt, inkubiert und bestrahlt. Nicht zu bestrahlende Ansätze, zur Beurteilung der reinen Substanzwirkung ohne UV-Bestrahlung, wurden mit Aluminiumfolie abgedeckt und ebenfalls unter die UV-Quellen gebracht, um sie dem gleichen Wärmeeinfluß auszusetzen. Da die Testsubstanzen ohne UV-Bestrahlung kaum eine Wirkung auf das Wachstum von *Candida albicans* ausgeübt haben, und nach Inkubation und anschließender UV-Bestrahlung das *Candida albicans*-Wachstum beeinflusst haben, kann man auf ihre phototoxische Wirkung schließen. Meist resultierte eine Erniedrigung der maximalen Zelldichte, welche wahrscheinlich mit den Zellschäden, die im Elektronenmikroskop sichtbar sind (101) zusammenhängen. Veränderungen in der initialen Wachstumsgeschwindigkeit (Steilheit der Wachstumskurven in der

Vermehrungsperiode) konnten zur quantitativen Testauswertung nicht herangezogen werden, da in diesem Bereich die größten Unregelmäßigkeiten in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlungsintensität auftraten. Außerdem ließen die einzelnen Populationsanalysen eine Bestimmung der Vermehrungsgeschwindigkeit nur bedingt zu, da die Zellen in Kultur sehr schnell wachsen (logarithmische Wachstumskurven). Vergleich man die maximalen Zelldichten der fünf Carprofen-Testansätze, so stellte man fest, daß die Schwankung mit  $\pm 3-5\%$  gering war. Gute Reproduzierbarkeit war bei identischer Testdurchführung gegeben.

Der CAPIT ist nach Vergleich mit anderen Testmodellen (siehe unten) zur Beurteilung phototoxischer Substanzwirkungen gut verwendbar. Die Testdurchführung ist möglichst einfach gehalten, und der Materialaufwand relativ gering. Der Zeitaufwand ist jedoch größer, da zweimal täglich an sämtlichen Ansätzen die Zelldichte bestimmt werden sollte, um einen momentanen Wachstumsstand festzustellen. Auch wenn zur quantitativen Auswertung nur die maximalen Zelldichten herangezogen wurden, ist es doch sinnvoll, das Wachstumsverhalten genauer zu beobachten, zumal dadurch ein verzögerter Wachstumsbeginn oder eine verminderte Vermehrungsgeschwindigkeit deutlich wird.

So erhält man über die Veränderungen des normalen *Candida albicans*-Wachstums durch phototoxische Substanzwirkungen wesentlich mehr Informationen als mit den herkömmlichen Testmodellen. Daher empfehlen wir den CAPIT zur Anwendung an weiteren Substanzen.

## 5.2. 8-Methoxypsoralen

### 5.2.1. Testung von 8-Methoxypsoralen mit Candida albicans

Bei der PUVA-Anwendung zur Psoriasistherapie wird eine 8-Methoxypsoralenkonzentration im Bereich von 8 bis 2170 ng/ml Serum erreicht (116). Dieser physiologische Wirkstoffspiegel entspricht in etwa einer Konzentration von  $10^{-8}$  bis  $10^{-5}$  M (2,1618 ng/ml bis 2161,8 ng/ml). Die im CAPIT verwendete niedrigste Konzentration war  $5 \cdot 10^{-6}$  M (1080,9 ng/ml), eine Konzentration, die im Bereich des physiologischen Wirkstoffspiegels im Serum liegt, und daher im Bezug auf die klinische Relevanz Bedeutung besitzt. Die schwächste Schwarzlicht-Bestrahlungsdosis, mit der hier eine Hemmung des Candida albicans-Wachstums nachgewiesen werden konnte, betrug  $0,5 \text{ J/cm}^2$ . Nach einer leicht reduzierten Wachstumsgeschwindigkeit stellte sich eine maximale Zelldichte ein, die 95 % vom Leerwert erreicht hat. Dies entsprach einer wenn auch schwachen Hemmung von 5 %. Wurde bei gleichbleibender 8-Methoxypsoralenkonzentration die Schwarzlichtdosis auf bis zu  $10 \text{ J/cm}^2$  erhöht, so war die phototoxische Substanzwirkung deutlicher: Eine Hemmung von 21 % war das Ergebnis. Knudsen (64) verwendete unter anderem ebenfalls Candida albicans zur Erfassung der phototoxischen Wirkung von 8-Methoxypsoralen in Verbindung mit UV-A-Bestrahlung. Dabei wurde das 8-Methoxypsoralen bereits dem Agar beigemischt, eine Hefensuspension gleichmäßig auf der Oberfläche des Agars verteilt, anschließend mit UV-A bestrahlt und darauf bei  $26^\circ\text{C}$  bebrütet. Es wurden dann die einzelnen wachsenden Kolonien gezählt und mit der Kontrollgruppe (Leerwert) verglichen. Knudsen definierte die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) als die Dosis von 8-Methoxypsoralen plus UV-A,

die die Zahl der Kolonien auf die Hälfte des Kontrollwertes reduziert. Die MIC beträgt bei *Candida albicans* nach Knudsen 1-3  $\mu\text{g/ml}$  bei 4  $\text{J/cm}^2$  UV-A, und 3  $\mu\text{g/ml}$  bei Reduzierung der UV-A-Dosis auf 1-2  $\text{J/cm}^2$ .

Oberste-Lehn und Plempel (83) suchten ebenfalls Testmodelle, die eine Messung und Objektivierung der phototoxischen Wirksamkeit von 8-Methoxypsoralen in Verbindung mit Schwarzlicht ermöglichen. Auch sie arbeiteten unter anderem mit *Candida albicans*: Die Zellsuspension wurde gleichmäßig auf dem Agar ausgespatelt und Testblättchen (0,5 cm  $\varnothing$ ) wurden mit 8-Methoxypsoralen beschickt. Dann wurden die Testblättchen zur Vordiffusion des 8-Methoxypsoralen auf die beimpften Petrischalen gelegt und im Kühlschrank (4°C, 6 h) gelagert. Anschließend wurde bei 28°C für 12 h vorbebrütet, schließlich mit ca. 2,86 J Blacklight bestrahlt, und wieder für 24-48 h weiterbebrütet. Gemessen wurden die Hemmzonen um die Testblättchen. Bei den 8-Methoxypsoralen-Konzentrationen 0,1 und 0,5  $\mu\text{g/Testblättchen}$  ergab sich keine Hemmzone, bei 1 bis 5  $\mu\text{g/Blättchen}$  entstanden Hemmzonen zwischen 28 und 33 mm. Mit 10  $\mu\text{g}$  8-Methoxypsoralen konnten nur geringfügig größere Hemmzonen erreicht werden. Der Wirkungstyp war hierbei fungistatisch, da die Keime aus den Hemmzonen rekultivierbar waren.

Scherwitz et al (101) untersuchten die *Candida albicans*-Zellen nach 8-Methoxypsoralen-Einwirkung und anschließender UV-A-Bestrahlung mit dem Elektronenmikroskop. Die Hefen wurden 1 h inkubiert (niedrigste Testsubstanzkonzentration war 1,0  $\mu\text{g/ml}$  Medium), dann mit 4,8  $\text{J/cm}^2$  Blacklight bestrahlt und nach dreimaligem Waschen mit Pufferlösung in Dunkelheit aufbewahrt. Die Untersuchungen erfolgten nach 2 h und 24 h. 2 h nach der Behandlung waren regressive Veränderungen der

Zellen zu beobachten: Man erkannte Schäden an den Mitochondrien und im Zytoplasma. Die Folge war eine Wachstums-  
hemmung. Nach 24 h wurde eine progressive Zellwand-  
massenneubildung sichtbar, die der innersten Wandschicht  
kugel- oder sichelförmig aufgelagert war. Die Zellen  
wuchsen weiter.

Die beschriebenen Testmodelle basieren alle auf dem  
System *Candida albicans*, 8-Methoxypsoralen und Schwarz-  
licht. Da die Ergebnisse der Testmodelle auf unter-  
schiedlichen Wegen zu Stande kommen, ist es interessant,  
diese Ergebnisse näher zu betrachten. Um direkt ver-  
gleichen zu können, sind 8-Methoxypsoralen-UV-A-Dosen  
in Tabelle 15 zusammengestellt, die ausreichen, um  
eine phototoxische Wirkung an *Candida albicans* auszu-  
lösen.

| <u>Testmodell</u>          | <u>8-MOP</u>         | <u>Schwarzlicht</u>    | <u>Wirkung</u>                |
|----------------------------|----------------------|------------------------|-------------------------------|
| CAPIT                      | 1,0 µg/ml            | 0,5 J/cm <sup>2</sup>  | 5 % Hemmung                   |
| Knudsen<br>(MIC)           | 1-3 µg/ml            | 4 J/cm <sup>2</sup>    | 50 % Kolonien-<br>reduzierung |
| Oberste-Lehn<br>u. Plempel | 1-5 µg/<br>Blättchen | 2,86 J/cm <sup>2</sup> | 28-33 mm<br>Hemmzone          |
| Scherwitz<br>et al         | 1,0 µg/ml            | 4,8 J/cm <sup>2</sup>  | im EM sicht-<br>bare Schäden  |

Tabelle 15: 8-Methoxypsoralen (8-MOP)- und Schwarzlicht  
-Dosen, die eine phototoxische Wirkung an  
*Candida albicans* auslösen

Diese Aufstellung zeigt, daß eine 8-Methoxypsoralenkon-  
zentration von 1-3 µg/ml, in Kombination mit 0,5-4,8  
J/cm<sup>2</sup> langwelligem UV-Licht, phototoxische Reaktionen  
an *Candida albicans* auslöst.

Zu bedenken ist nicht nur, daß die Testmodelle selbst sehr unterschiedlich sind, sondern auch, daß das Verfahren mit der Substanz, die spektrale Lichtzusammensetzung, die Abstammung der Hefen und die Nährmedien unterschiedlich waren.

Das Verfahren mit der Testsubstanz 8-Methoxypsoralen sollte beachtet werden. So wurde beim CAPIT die Reinsubstanz in Eisessig gelöst, und anschließend mit TCM-Puffer aufgefüllt. Durch Zugabe der entsprechenden Zellsuspensionsmenge bzw. vorheriger Weiterverdünnung mit TCM-Puffer erhielt man die gewünschten Konzentrationen an den Zellen. Nach der Bestrahlung wurden die Ansätze in flüssige Nährlösung abgeimpft. Hierbei wurden die 8-Methoxypsoralenkonzentrationen um den Faktor 41 verdünnt. Eine eventuelle Testsubstanzwirkung nach der UV-Bestrahlung wurde somit vermindert. Eine Substanzwirkung der benutzten Lösungs- und Verdünnungsmittel wurde durch Verwenden entsprechender Leerwerte berücksichtigt.

Auch die Einwirkzeit der Testsubstanz auf die Hefen (Inkubation) ist von Wichtigkeit: Entsprechende CAPIT-Testversuche zeigten, daß z.B. bei einer 8-Methoxypsoralenkonzentration von  $10^{-3}M$ , bei einer Inkubationszeit von 0,5 h vor  $25 J/cm^2$  UV-A-Bestrahlung, eine Hemmung von 33 % resultiert, während bei einer Inkubationszeit von 2,5 h, und sonst gleichartiger Behandlung, eine Hemmung von 100 % entsteht. Es ist daher nötig, die Einwirkzeit konstant zu halten.

Knudsen (64) gab 8-Methoxypsoralen direkt in den Agar, beschrieb aber nicht, wie er die Reinsubstanz in Lösung brachte. Die Inkubationszeit vor der Bestrahlung hielt er möglichst kurz, die Testsubstanz war während des Wachstums der Zellen stets anwesend.

Oberste-Lehn und Plempel (83) lösten 8-Methoxypsoralen in Alkohol, gaben die Lösung auf die Testblättchen, und ließen den Alkohol wieder verdunsten. Die trockenen Blättchen wurden zur Vordiffusion des 8-Methoxypsoralen auf die beimpften Petrischalen gelegt. Die Einwirkzeit vor der Bestrahlung betrug: 6 h im Kühlschrank plus 12 h Vorbebrütung bei 28°C. Das 8-Methoxypsoralen war dann im Agar in bestimmter Konzentration anwesend.

Scherwitz et al (101) lösten 8-Methoxypsoralen in 50%igem Ethanol, und nannten eine Einwirkzeit von 1 h vor der Belichtung. Nach der Bestrahlung (Dauer 20 Min.) wurden die Zellen dreimal mit Pufferlösung gewaschen, wodurch die 8-Methoxypsoralenkonzentration stark abnahm.

Beim Menschen wird die therapeutische 8-Methoxypsoralen-Dosis oral verabreicht. Abhängig vom Magen-Darm-Füllungszustand und von der 8-Methoxypsoralen-Kristallgröße wird nach ca. 2 h die maximale Serumkonzentration erreicht. Innerhalb der nächsten 2 h fällt die 8-Methoxypsoralenkonzentration in Serum und Haut wieder stark ab (116). Diese Tatsache spricht dafür, daß auch in den Testmodellen nach der UV-Belichtung die 8-Methoxypsoralenkonzentration erniedrigt wird, um eine mögliche spätere Substanzwirkung auszuschließen. Diese Forderung wird im CAPIT erfüllt.

Höhere 8-Methoxypsoralenkonzentrationen ergaben ausgeprägtere phototoxische Reaktionen. Im CAPIT wurden zusätzlich die Konzentrationen  $10^{-4}$  und  $10^{-3}$  M der Testung zugeführt. Da die Ergebnisse fast durchweg aus höheren Hemmwerten bei gleichbleibenden Bestrahlungsintensitäten bestanden, wurde in den folgenden Testungen fast ausschließlich die Konzentration  $10^{-3}$  M verwendet, zumal

dadurch schwächer phototoxisch wirksame Substanzen leichter erfaßt werden konnten.

8-Methoxypsoralen besitzt seine Lichtabsorptionsmaxima bei 217-219 nm, 248-249 nm und bei 300-303 nm. Der maximale Hauteffekt mit 8-Methoxypsoralen liegt zwischen 320 und 400 nm, besonders bei 365 nm (116).

Vergleichen wir die Ergebnisse von CAPIT, die mit drei verschiedenen Lichtquellen erzielt wurden, so finden wir von den Lichtquellen abhängige Hemmungswerte:

Mit  $1 \text{ J/cm}^2$  Schwarzlicht, wie es zur PUVA-Therapie eingesetzt wird, erhielten wir einen Hemmungswert von 24 % (8-Methoxypsoralenkonzentration:  $10^{-3} \text{ M}$ ). Verwendeten wir UV-A-Licht, lag das Ergebnis bei gleicher Intensität bei 45 % Hemmung. Nach  $1 \text{ J/cm}^2$  UV-B-Be-strahlung war eine 97%ige Hemmung festzustellen.

Betrachten wir die spektralen Verteilungskurven der verwendeten Lichtquellen, so stellen wir fest, daß die UV-B-Lichtquellen ihren Hauptemissionsbereich bei 310-315 nm besitzen und auch um 300 nm stark abstrahlen. Diese 300-303 nm entsprechen einem der Lichtabsorptionsmaxima von 8-Methoxypsoralen. Es ist möglich, daß dies der Grund für die starke phototoxische Reaktion nach UV-B-Bestrahlung ist. Wollte man versuchen, die unterschiedlichen Ergebnisse nach UV-A- und Schwarzlichtbestrahlung zu erklären, könnte man die Wellenlängen des maximalen Hauteffektes mit 8-Methoxypsoralen heranziehen. Hier sind 365 nm besonders wirksam. Bei Schwarzlicht ist die Intensität bei 365 nm geringer als bei der UV-A-Lichtquelle. Auf CAPIT übertragen wäre es somit verständlich, daß die phototoxische Reaktion nach UV-A-Bestrahlung stärker ausfällt, als nach Schwarzlichtbestrahlung. Insgesamt sind die Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen und der spektralen Emission

der Lichtquellen nicht eindeutig interpretierbar.

#### 5.2.2. Andere Modelle zur Erfassung der phototoxischen Wirkung von 8-Methoxypsoralen

In der Literatur sind zur Erfassung der phototoxischen Wirkung von 8-Methoxypsoralen viele Testmodelle mit den unterschiedlichsten Testzellen beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit sollen nur einzelne Testmodelle in ihrer Grundidee genannt, und deren Resultate den Ergebnissen von CAPIT gegenübergestellt werden.

Morison et al (80) verwendeten Suspensionen menschlicher Lymphozyten, denen die Testsubstanz vor der Bestrahlung zugegeben wurde. Im Anschluß wurde der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA gemessen. Der Thymidineinbau war nach  $1,0 \mu\text{g/ml}$  8-Methoxypsoralen (ca.  $4,6 \cdot 10^{-6} \text{M}$ ) und  $0,019 \text{ J/cm}^2$  UV-A (320-400 nm) auf 50 % des Leerwertes reduziert.

Wulf (116) arbeitete unter anderem mit Lymphozyten in vitro. Wirkte 8-Methoxypsoralen in hoher Konzentration ( $10^{-2} \text{M}$ ) auf Lymphozyten ein, so bauten diese weniger Thymidin ein. Wurde die Konzentration unter  $1,17 \mu\text{g/ml}$  ( $5,4 \cdot 10^{-6} \text{M}$ ) reduziert, so war diese Wirkung nur mit zusätzlicher UV-A-Bestrahlung auslösbar. Mit Erhöhung der UV-A-Dosis wurde der Thymidineinbau zunehmend gehemmt, und es konnten Chromosomenbrüche in den Lymphozytenkulturen nachgewiesen werden.

Krüger et al (68) gaben eine deutliche Reduzierung des Thymidineinbaus bei menschlichen Lymphozyten bei einer 8-Methoxypsoralenkonzentration von  $0,1 \mu\text{g/ml}$  und  $0,5 \text{ J/cm}^2$  Blacklight an. Eine über 50%ige Hemmung des Thymidineinbaus wurde nach Testsubstanzkonzentration von  $0,1 \mu\text{g/ml}$  und  $1 \text{ J/cm}^2$  Bestrahlung festgestellt.

Nach Kraemer et al (67) bewirkt die Behandlung menschlicher Lymphozyten mit einer 8-Methoxypsoralenkonzentration von 0,01-1,0  $\mu\text{g/ml}$  plus 0,1-2,9  $\text{mJ/cm}^2$  UV-A eine deutliche Thymidineinbaureduzierung. Diese Wirkung trat nicht ein, wenn nur mit UV-A bestrahlt wurde.

All diese Behandlungen mit 8-Methoxypsoralen und UV-A in therapeutischen Dosierungen bewirkten eine Verminderung der zellulären DNA-Synthese.

Okamoto et al (86) untersuchten die T-Lymphozytenmigration von Mäusen in vitro. So wurde die Migration ab einer 8-Methoxypsoralenkonzentration von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  in Verbindung mit 0,5  $\text{J/cm}^2$  UV-A unterdrückt.

Bredberg et al (13, 14) zeigten an menschlichen Hautfibroblasten in vitro, daß klinisch verwendete PUVA-Dosierungen (8-Methoxypsoralen: 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ; UV-A: 0,9-4,0  $\text{J/cm}^2$ ) zu DNA- und Chromosomenschäden geführt haben.

Nach Verhagen et al (110) werden menschliche Monozyten und Makrophagen tödlich geschädigt durch Dosierungen, die bei normaler klinischer PUVA-Anwendung auftreten. Eine deutliche Reduzierung der Zellzahl durch Zelltod (30-50 %) trat nach 8-Methoxypsoralenkonzentration von 0,5  $\mu\text{g/ml}$  und 1,2  $\text{J/cm}^2$  UV-A-Bestrahlung ein.

Kobayashi et al (65) untersuchten unter anderem das Überleben von *Escherichia coli* nach PUVA-Behandlung. Die Bakterienzahl wurde erst ab 23 mM (ca. 5000  $\mu\text{g/ml}$ ) 8-Methoxypsoralen und 7,3  $\text{J/cm}^2$  UV-A-Bestrahlung signifikant vermindert.

Die genannten Versuchsmodelle bestätigen alle die phototoxische Wirkung von 8-Methoxypsoralen. Nur die Ergebnisse, die auf Reaktionen menschlicher Zellen beruhen, lassen einen Schluß auf die phototoxische

Wirksamkeit am Menschen zu: So ist es wahrscheinlich, daß Zellen, die in vitro durch die PUVA-Behandlung einen meßbaren Schaden erleiden, auch in vivo im menschlichen Körper eine entsprechende Veränderung erfahren. Bezugnehmend auf die oben genannten Konzentrationen und Intensitäten, die eine phototoxische Wirkung auslösen, kann man sagen, daß sich die Bakterien gegenüber der getesteten PUVA-Therapie wesentlich stabiler verhalten als die menschlichen Zellen. Die Hefen liegen mit ihrer Empfindlichkeit zwischen den menschlichen Zellen und den Bakterien. Auch Oberste-Lehn und Plempel (83) bezeichnen in diesem Zusammenhang die getesteten Pilzspezies (unter anderem die Hefen) im Vergleich zu den Bakterien als hoch empfindlich. Zusammenfassend ist festzuhalten, daß CAPIT im Vergleich zu anderen Testverfahren mit 8-Methoxypsoralen ähnliche Ergebnisse erbringt und daher auch für Phototoxizitätstestungen mit anderen Substanzen geeignet ist.

### 5.3. Nichtsteroidale Antirheumatika

Die in den vorliegenden Versuchen beschriebenen Photosensibilisierungen sind photobiologische Reaktionen. Dies sind Effekte von nicht-ionisierender elektromagnetischer Strahlung (Licht) auf biologische Systeme. Photosensibilisierung ist eine Unverträglichkeitsreaktion durch Licht, hervorgerufen durch definierte endogene oder exogene Substanzen. Sensibilisierung hat in diesem Zusammenhang nichts mit einer immunologischen Reaktion zu tun. Ein Photosensibilisator ist eine Substanz, die elektromagnetische Strahlung absorbiert und andere Moleküle verändert. Die Photoallergie

ist eine immunologisch bedingte Photosensibilisierung (30, 31, 54, 61, 109), wogegen der phototoxischen Reaktion eine nicht-immunologische Photosensibilisierung zu Grunde liegt.

Bekannte photochemische Reaktionstypen sind: Cis-Trans-Isomerisierung, Zykladdition, lineare Photoaddition, intramolekulare Strukturveränderung, Photoionisierung und Fragmentierung (66). Über die Mechanismen phototoxischer Reaktionen ist wenig bekannt. Nach neuesten Untersuchungen können Tetracycline, die häufig Auslöser phototoxischer Reaktionen sind, über unterschiedliche Mechanismen phototoxisch wirken (47). Außerdem ist davon auszugehen, daß sich bei klinischen Reaktionen nicht selten phototoxische und photoallergische Mechanismen überlagern. Über den Reaktionsmechanismus der Photosensibilisierung durch nichtsteroidale Antirheumatika gibt es nur Spekulationen. Es gibt einige Arbeiten, die sich mit der Beziehung zwischen Arachidonsäure-Stoffwechsel und UV-Bestrahlung beschäftigen (1, 9, 10, 11, 20, 40, 44, 98, 105, 117). Danach werden phototoxische Prozesse, wie z.B. das UV-B-Erythem durch nichtsteroidale Antirheumatika eher gehemmt (9, 10, 11, 26, 27, 40, 41, 105, 106).

Die UV-sensibilisierenden nichtsteroidalen Antirheumatika Benoxaprofen, Carprofen, Tiaprofensäure und Ketoprofen gehören alle zu den Propionsäurederivaten. Daher wurde die Vermutung geäußert, ob hier nicht der Propionsäurerest für die UV-Überempfindlichkeit verantwortlich ist (91). Ebenso könnten aber auch die an die Propionsäure gebundenen Ringsysteme für die photosensibilisierende Wirkung von Bedeutung sein. Das Ringsystem von Carprofen (Carbazol) wird auf Grund seiner Lumineszenz für die Herstellung UV-empfindlichen photographischen Materials verwendet (97).

Die im CAPIT mit nichtsteroidalen Antirheumatika erzielten Ergebnisse werden verglichen mit Ergebnissen, die mit anderen Testmethoden gefunden wurden. Die Ergebnisse des Photopatchtestes (PPT) beruhen auf der Untersuchung an 177 Patienten (94). Bestrahlt wurde mit UV-A, UV-B und einer Kombination von UV-B und UV-A. Die positiven Reaktionen waren meist durch UV-A allein auslösbar.

Der Photohämolysetest (PHT) basiert auf der Hämolyse von Hammelerythrozyten. Sie wird durch Inkubation der Erythrozyten mit den Testsubstanzen ( $10^{-3}M$ ) und anschließender Exposition mit UV-A ausgelöst (93, 103). Im Photo-Basophilen-Histamin-Freisetzungstest (PBHRT) wird die Histaminfreisetzung von peripheren menschlichen Leukozyten, nach Stimulierung mit der Testsubstanz ( $10^{-3}M$ ) und UV-A-Bestrahlung, bestimmt (93, 103). Der PPT, der PHT und der PBHRT wurden mit den selben UV-Lichtquellen durchgeführt, wie sie auch für den CAPIT verwendet wurden.

Aus klinischen Beobachtungen ist eine Photosensibilisierung durch die nichtsteroidalen Antirheumatika Benoxaprofen, Carprofen und Tiaprofensäure gesichert (33, 77, 92). So werden mit Benoxaprofen am Patienten eine erythematöse, von der Dosis abhängig auch urticarielle, subjektiv juckende, stechende oder brennende Sofortreaktion, aber auch verzögert auftretende Erytheme und Photoonycholyse beobachtet (19, 42, 63, 75, 115). Der hierbei ausgelöste Mechanismus hat sein Aktionsspektrum im UV-A- und auch im UV-B-Bereich (32, 33, 42, 63, 115).

Im CAPIT ergab sich für Benoxaprofen im UV-A-Bereich eine 33%ige Hemmung (nach  $100 J/cm^2$ ) und im UV-B-Bereich eine Hemmung von 24 % (nach  $500 mJ/cm^2$ ).

Benoxaprofen ist also deutlich phototoxisch wirksam. Im PHT wurde für Benoxaprofen (nach UV-A-Bestrahlung) mit 2 % Hämolyse keine wesentliche phototoxische Wirkung gefunden. Im PBHRT kam es mit 10 % Histaminfreisetzung zu einer geringen Wirkung nach  $50 \text{ J/cm}^2$  UV-A-Bestrahlung (93). Ljunggren et al (71) verwendeten andere Lichtquellen und fanden ebenfalls, daß Benoxaprofen bei Testungen an Mäusen (in vivo) und an *Candida albicans* (in vitro) phototoxisch wirksam ist. Sie stellten bei einem Photohämolysetest mit  $100 \text{ µg/ml}$  Benoxaprofen (nach  $10,8 \text{ J/cm}^2$  UV-A) eine 100%ige Hämolyse, auch nach UV-B-Bestrahlung fest. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß sich das Aktionsspektrum der Benoxaprofen-Photoaktivität über den UV-A- und den UV-B-Bereich erstreckt. Die diskrepanten Ergebnisse in den beiden Photohämolysetests könnten darauf beruhen, daß UV-Quellen mit unterschiedlichem Emissionsspektrum benutzt wurden. In der Abbildung 10 ist das initiale Wachstum des Leerwertansatzes nach  $500 \text{ mJ/cm}^2$  UV-B-Bestrahlung (Kurve a) deutlich gegenüber der Vermehrung des entsprechenden Testansatzes mit Benoxaprofen (Kurve b) gebremst. Benoxaprofen scheint hier also initial die im Leerwert zu beobachtende, durch UV-B induzierte Wachstumsbeeinträchtigung zu hemmen. Auch Ljunggren (70) beobachtete, daß einige nichtsteroidale Antirheumatika die im Leerwert festzustellende, durch UV-B induzierte Photohämolyse reduzieren. Ein Zusammenhang mit den UV-Absorptionsspektren dieser Substanzen wäre möglich. Membranstabilisierende Effekte wurden von den hier getesteten Substanzen bisher nicht beschrieben. Benoxaprofen ist also einerseits als phototoxisch zu beurteilen, andererseits kann es aber offensichtlich die Wirkung, die von UV-B-Licht alleine ausgelöst wird, beeinflussen.

Die pathologischen Reaktionen im Zusammenhang mit Carprofen sind photoinduzierte Arzneiexantheme, die sich klinisch durch teilweise urtikarielle Erytheme, erythematöse Papeln, Vesikeln und Blasen mit partiell hämorrhagischem Aspekt auszeichnen (7, 39, 52, 60, 77, 85, 90).

Im CAPIT resultierte für Carprofen im UV-A-Bereich eine absolute Hemmung (100 %) nach  $50 \text{ J/cm}^2$ . Höhere Intensitäten ( $100 \text{ J/cm}^2$  UV-A) schienen die phototoxische Wirkung von Carprofen zu schwächen. Auch im PBHRT wurde dies gefunden. Im CAPIT wurde nach  $500 \text{ mJ/cm}^2$  UV-B-Bestrahlung mit Carprofen eine Hemmung von 43 % erreicht. Carprofen wird als sehr stark phototoxisch eingestuft. Dies stimmt überein mit dem PPT-Ergebnis: Hier wurden für Carprofen in 24,4 % positive Reaktionen gefunden (94). Auch im PBHRT zeigte sich mit 40 % Histaminfreisetzung nach  $25 \text{ J/cm}^2$  UV-A-Bestrahlung, daß Carprofen stark phototoxisch wirksam ist (93, 103). Der PHT zeigte eine nur schwache Hämolyse von 3 % (93). Ljunggren stellte ebenfalls die phototoxische Wirkung von Carprofen fest (70). Er fand im PHT eine 100%ige Hämolyse mit  $100 \text{ µg/ml}$  Carprofen bei  $43,2 \text{ J/cm}^2$  UV-A-Bestrahlung. Auch hier sind die Ergebnisse der beiden Photohämolyse-tests wahrscheinlich wegen der unterschiedlichen Lichtquellen sehr verschieden. Zusammenfassend läßt sich Carprofen als stark phototoxisch bezeichnen.

Es gibt noch keine gesicherten Beschreibungen über klinische Photosensibilisierungen durch Diclofenac oder Ketoprofen. Die In-vitro-Tests zeigen aber deutlich, daß phototoxische Wirkungen vorhanden sind. Diese Tatsache gibt Anlaß davon auszugehen, daß die phototoxische Wirkung dieser Substanzen in vivo nicht auftritt und könnte einen Ansatz zur Aufdeckung der für die In-vivo-Photosensibilisierung durch nicht-

steroidale Antirheumatika zu Grunde liegenden Mechanismen ergeben.

Im CAPIT löste Diclofenac nach Bestrahlung mit  $50 \text{ J/cm}^2$  UV-A eine Hemmung von 20 % aus. Wurde mit  $500 \text{ mJ/cm}^2$  UV-B bestrahlt (Abbildung 14), war der Wachstumsbeginn des Leerwertansatzes verzögert (Kurve a). Der Testansatz mit Diclofenac und UV-B-Bestrahlung zeigte diese Verzögerung nicht, aber dessen Vermehrungsgeschwindigkeit war insgesamt kleiner (Steilheit der Kurve b ist geringer). So resultiert mit Diclofenac nach  $500 \text{ mJ/cm}^2$  UV-B-Bestrahlung eine Hemmung von 67 %, und nach  $1000 \text{ mJ/cm}^2$  eine 100%ige Hemmung. Diclofenac zeigt also im UV-A-Bereich eine relativ schwache, im UV-B-Bereich eine sehr starke phototoxische Wirkung, hemmt aber offensichtlich auch die durch UV-B allein induzierte Wachstumsverzögerung.

Im PPT wurden für Diclofenac in 6,7 % positive Reaktionen gefunden (94), und im PHT wurden 3 % Hämolyse festgestellt (93). Im PBHRT kam es mit Diclofenac nach  $100 \text{ J/cm}^2$  UV-A-Bestrahlung zu einer Histaminfreisetzung von 28 %. Auch nach Ljunggren (70) ist Diclofenac bei Testung in einem PHT nach UV-A- oder UV-B-Belichtung phototoxisch wirksam.

Mit Ketoprofen kam es im CAPIT nach  $25 \text{ J/cm}^2$  UV-A-Bestrahlung zu einer Verzögerung des Wachstumsbeginns um ca. 20 h. Nach  $50 \text{ J/cm}^2$  UV-A-Bestrahlung war eine vollständige Hemmung des *Candida albicans*-Wachstums erreicht. Damit zeigte sich die starke phototoxische Wirkung von Ketoprofen mit UV-A-Licht. Nach UV-B-Bestrahlung wurde keine derartige Wirkung gefunden. Es zeigte sich lediglich, daß sich die Hefen nach Behandlung mit Ketoprofen und UV-B-Bestrahlung schneller vermehrten, als nach UV-B-Bestrahlung allein.

Im PPT reagierten 3,8 % der Getesteten positiv auf Ketoprofen. Der PHT erbrachte 43 % Hämolyse, und der PBHRT zeigte 55 % Histaminfreisetzung. Ketoprofen ist also stark phototoxisch wirksam. Auch Ljunggren (70) kommt zu diesem Ergebnis.

Mit Tiaprofensäure resultierte im CAPIT nach  $50 \text{ J/cm}^2$  UV-A-Bestrahlung eine Hemmung von 100 %. Diese sehr starke phototoxische Reaktion wurde im UV-B-Bereich nicht gefunden. Hier fand sich nach  $1000 \text{ mJ/cm}^2$  UV-B-Bestrahlung eine Hemmung von 15 %. Auch bei Anwesenheit von Tiaprofensäure zeigte sich im UV-B-Bereich, daß die durch UV-B induzierte initiale Vermehrungsbeeinträchtigung gehemmt wurde.

Im PPT wurden in 24,6 % positive Reaktionen gefunden. Mit Tiaprofensäure kam es im PHT zu einer Hämolyse von 43 %, im PBHRT zu einer Histaminfreisetzung von 39 %. Die Ergebnisse zeigen die starke phototoxische Wirkung von Tiaprofensäure auf. Das Aktionsspektrum liegt nach den bisherigen Ergebnissen vermutlich mehr im UV-A- als im UV-B-Bereich (37, 38, 92).

Tabelle 16 gibt einen Überblick über die beobachteten photosensibilisierenden Wirkungen nichtsteroidaler Antirheumatika. Betrachten wir die In-vitro-Untersuchungen, so stellen wir fest, daß CAPIT durchaus empfindlich genug ist, um mit den anderen Testmethoden verglichen zu werden. Die maximalen Reaktionen waren beim CAPIT meist mit  $50 \text{ J/cm}^2$  UV-A-Belichtung (oder mit  $500\text{-}1000 \text{ mJ/cm}^2$  UV-B) erreichbar. Dies entspricht der Empfindlichkeit anderer Testverfahren (70, 93). Beim PBHRT lösten auch niedrigere Substanzkonzentrationen, die bei PHT und CAPIT nicht immer eine deutliche Wirkung zeigten, Histaminfreisetzung aus. Die beiden Photohämolysetests (70, 93) zeigten bei Testung

|                                            | <u>BXP</u> | <u>CPF</u> | <u>DCF</u> | <u>KPF</u> | <u>TPA</u> |
|--------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <u>CAPIT</u>                               |            |            |            |            |            |
| Hemmwert (%)                               |            |            |            |            |            |
| UV-A                                       | 33         | 100        | 20         | 100        | 100        |
| UV-B                                       | 24         | 43         | 100        | 9          | 15         |
| <u>PPT</u> (94)                            |            |            |            |            |            |
| pos. Reaktion (% der getesteten Patienten) |            |            |            |            |            |
| UV-A und UV-B                              | -          | 24,4       | 6,7        | 3,8        | 24,6       |
| <u>PBHRT</u> (93)                          |            |            |            |            |            |
| Histaminfreisetzung (%) , UV-A             | 10         | 40         | 28         | 55         | 39         |
| <u>PHT</u> (93)                            |            |            |            |            |            |
| Hämolyse (%)                               |            |            |            |            |            |
| UV-A                                       | 2          | 3          | 3          | 43         | 43         |
| <u>PHT</u> (70, 71)                        |            |            |            |            |            |
| Hämolyse (%)                               |            |            |            |            |            |
| UV-A                                       | 100        | 100        | 35         | 100        | -          |
| <u>CAWH</u> (71)                           |            |            |            |            |            |
| Hemmzone (mm)                              |            |            |            |            |            |
| UV-A                                       | 11         | 14         | 7          | 16         | -          |

Tabelle 16: Überblick über die photosensibilisierenden Wirkungen der nichtsteroidalen Antirheumatika Benoxaprofen (BXP), Carprofen (CPF), Diclofenac (DCF), Ketoprofen (KPF) und Tiaprofensäure (TPA). Candida-Albicans-Photo-Inhibitions-Test (CAPIT), Photopatch-Test (PPT), Photo-Basophilen-Histamin-Freisetzungs-Test (PBHRT), Photohämolyse-Test (PHT), Candida-Albicans-Wachstums-Hemmung (CAWH). Angegeben sind jeweils die maximal gemessenen Werte.

von Benoxaprofen, Carprofen und Diclofenac stark differierende Ergebnisse. Ursache könnte die Verwendung unterschiedlicher Lichtquellen gewesen sein. Im Vergleich zu anderen Autoren, die Testmodelle mit anderen Testzellen untersuchten, finden sich teilweise deutliche Abweichungen, zum Teil aber auch weitgehende Übereinstimmung. Dies liegt an den verwendeten Testobjekten, tatsächlichen Substanzkonzentrationen, Inkubationszeiten, Bestrahlungsintensitäten und spektralen Zusammensetzungen der benutzten Lichtquellen. Entsprechende Angaben sind stets zu fordern, einheitliche Bedingungen, insbesondere gleichartige UV-Quellen, wären wünschenswert, um die Ergebnisse der verschiedenen Testmodelle erschöpfend vergleichen zu können.

Es ist festzuhalten, daß die Ergebnisse verschiedener In-vitro-Methoden unterschiedlich sein können, und daß eine in vitro gefundene phototoxische Wirkung einer Substanz nicht unbedingt auch in vivo einen entsprechenden Befund erwarten läßt. Nur mit Hilfe von mehreren Testmodellen, die das Problem der Photo-toxizität aus verschiedenen Richtungen beleuchten, können phototoxische Substanzwirkungen erfaßt und vielleicht auch geklärt werden.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Es sind viele Substanzen bekannt, die beim Menschen nach lokaler oder systemischer Anwendung zu einer Photosensibilisierung führen können. In letzter Zeit fand in dieser Hinsicht vor allem die Substanzgruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika Interesse. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, in einem modifizierten In-vitro-Phototoxizitätstest mit *Candida albicans* (Candida-Albicans-Photo-Inhibitions-Test; CAPIT), die phototoxische Wirkung von nichtsteroidalen Antirheumatika zu erfassen. Untersucht wurden in unterschiedlichen Konzentrationen die nichtsteroidalen Antirheumatika Benoxaprofen, Carprofen, Diclofenac, Ketoprofen sowie Tiaprofensäure, als Kontrollsubstanz das Psoralen 8-Methoxypsoralen mit bekannter phototoxischer Wirkung und das in vivo phototoxische Tetracyclin Demeclocyclin, das in vergleichbaren In-vitro-Ansätzen keine phototoxische Wirkung besitzt, als Negativkontrolle.

Die Hefezellsuspensionen definierter Zelldichte (1 Million Zellen/ml) wurden mit den Testsubstanzen inkubiert und mit UV-Licht unterschiedlicher Wellenlängenbereiche bestrahlt. Als Bestrahlungsquellen dienten Leuchtstoffröhren (TL 20 W/12), die überwiegend im UV-B-Bereich emittieren (Maximum 315 nm), ein UV-B-freier UV-A-Strahler (UVASUN 5000; Maximum 375 nm) und Leuchtstoffröhren, die zur Photochemotherapie (PUVA) benutzt werden (Sylvania FR 90T/12/PUVA/HO; Maximum 350 nm). Die mit diesen drei Strahlungsquellen applizierten Dosen betrugen 0-1000 mJ/cm<sup>2</sup> UV-B (TL 20 W/12), 0-100 J/cm<sup>2</sup> UV-A

(UVASUN 5000) und  $0-10 \text{ J/cm}^2$  UV-A (Sylvania FR 90T/12/PUVA/HO). Nach der Bestrahlung wurden die Hefen in flüssige Nährlösung abgeimpft und das sich einstellende Wachstum (Zelldichte) durch Zellzählung mit dem Coulter Counter quantitativ im Zeitverlauf verfolgt. Hieraus wurde als "Hemmwert" die phototoxisch induzierte Inhibition des Zellwachstums ermittelt. Der Hemmwert gibt an, um wieviel Prozent die maximal erreichbare Zelldichte des substanzhaltigen Testansatzes unter derjenigen des substanzfreien Leerwertansatzes lag.

Nach Bestrahlung mit dem UV-B-freien UV-A-Strahler betrug die maximale phototoxische Hemmung des Zellwachstums bei Testung von Benoxaprofen 33 %, von Carprofen 100 %, von Diclofenac 20 %, von Ketoprofen und Tiaprofensäure jeweils 100 %. Wurde mit den überwiegend im UV-B-Bereich emittierenden Leuchtstoffröhren bestrahlt, so betrug die maximale phototoxische Hemmung des Zellwachstums bei Testung von Benoxaprofen 24 %, von Carprofen 43 %, von Diclofenac 100 %, von Ketoprofen 9 % und von Tiaprofensäure 15 %. Die Untersuchungen mit 8-Methoxypsoralen erbrachten bei Bestrahlungen mit dem UV-B-freien UV-A-Strahler und mit den Röhren des Photochemotherapiegerätes eine maximale phototoxische Hemmung des Zellwachstums von 30-40 %; wurde die überwiegend im UV-B-Bereich emittierende Strahlungsquelle verwendet, so kam es offensichtlich aufgrund des nicht zu vernachlässigenden UV-A-Anteiles zu einer maximalen Hemmung von 95 %. Die Testung von Demeclocyclin ergab in den verwendeten Ansätzen keine phototoxische Substanzwirkung.

Mit dem neu entwickelten Verfahren lassen sich phototoxische Substanzwirkungen durch die hemmende Wirkung auf das Wachstum von *Candida albicans* nachweisen und quantifizieren. Die hier mit 8-Methoxypsoralen und Demeclocyclin erzielten Ergebnisse stimmen gut überein mit den Ergebnissen anderer Testmodelle, die ebenfalls phototoxische Wirkungen auf *Candida albicans* erfassen. Im vorgestellten Testsystem können über die oben angegebenen Resultate hinaus auch Änderungen in der Kinetik des Zellwachstums erfaßt werden. Auch im Vergleich zu anderen In-vitro-Testverfahren erbrachte der CAPIT mit nichtsteroidalen Antirheumatika oder 8-Methoxypsoralen qualitativ vergleichbare Ergebnisse.

Das Testsystem ist gut geeignet, phototoxische Substanzwirkungen in vitro zu erfassen. Der CAPIT ist somit eine Bereicherung des Spektrums der Testverfahren, die derzeit zur Überprüfung phototoxischer Substanzwirkungen herangezogen werden; dieses sollte wegen des im allgemeinen unbekannten Pathomechanismus phototoxischer Effekte möglichst vielfältig sein.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adams SS, Humphries RG, Mason CG (1981) The relationship between development of ultraviolet erythema and release of prostaglandins in guinea pig skin. Agents Actions 11: 473-476
2. Addo HA, Ferguson J, Johnson BE, Frain-Bell W (1982) A study of benoxaprofen-induced photosensitivity. Br J Dermatol 107: 17-18
3. Anonymus (1982) Stort antal biverknigar av piroxicam. Försiktig dositrering vid behandlingsstart. Läkartidningen 79: 3821-3822
4. Bandmann HJ, Dohn W (1967) Die Epicutantestung. Bergmann, München
5. Barth J, Arnold T (1976) Zur Aussagekraft des Paramäzientestes für die Erfassung von Photosensibilisatoren. Dermatol Mschr 162: 900-904
6. Barth J, Fickweiler E, Hofmann C (1976) Spektrophotometrische Untersuchungen zur Erfassung von Photosensibilisatoren. Dermatol Mschr 162: 893-899
7. Bause R (1983) Photoallergische Arzneireaktionen auf Carprofen. Z Hautkr 59: 393
8. Bjellerup M, Ljunggren B (1984) Studies on photohemolysis with special reference on demethylchlor-tetracycline. Acta Derm Venerol (Stockh.) 64: 378-383
9. Black AK, Greaves MW, Hensby CN, Plummer NA (1978a) Increased prostaglandins  $E_2$  and  $F_{2\alpha}$  in human skin at 6 and 24 h after ultraviolet B irradiation (290-320 nm). Br J Clin Pharmacol 5: 431-436

10. Black AK, Fincham N, Greaves MW, Hensby CN (1980a) Time course changes in levels of arachidonic acid and prostaglandins  $D_2$ ,  $E_2$ ,  $F_{2\alpha}$  in human skin following ultraviolet B irradiation. *Br J Clin Pharmacol* 10: 453-457
11. Black AK, Ficham N, Graves MW, Hensby CN (1981b) Changes in levels of arachidonic acid and prostaglandins  $D_2$ ,  $E_2$ ,  $F_2$  and 6-oxo-PGF $_{1\alpha}$  in human skin within 48 hours following ultraviolet B irradiation. *Br J Dermatol* 105: 353-354
12. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH (1984) *Dermatologie und Venerologie* 3. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
13. Bredberg A (1981) DNA damage in human skin fibroblasts exposed to UVA light used in clinical PUVA treatment. *J Invest Dermatol* 76: 449-451
14. Bredberg A, Lambert B, Lindblad A, Swanbeck G, Wennersten G (1983) Studies of DNA and chromosome damage in skin fibroblasts and blood lymphocytes from psoriasis patients treated with 8-Methoxypsoralen and UVA irradiation. *J Invest Dermatol* 81: 93-97
15. Breit R (1975) Phototoxische und photoallergische Reaktionen der Haut. *Münch med Wschr* 117: 23-28
16. Bruinsma W (1972) Adverse reaction profiles of drug eruptions. *Dermatologica* 145: 377-388
17. Buchniecek (1976) Formveränderungen in durch Licht inhibierten Dermatophyten. *Acta Univ Olomuc, Fac med* 79: 219-229
18. Buchniecek (1976) Inhibice Rustu Dermatofyt. *Ceska Mykologie* 30 (1): 41-48

19. Chan GFQ, Prihoda M, Towers GHN, Mitchell JC (1977) Phototoxicity evoked by alpha-terthienyl. Contact Dermatitis 3: 215-216
20. Cleaver LJ, Gange RW, Folsom KJ (1981) Skin edema due to PUVA in the hairless mouse: effects of antihistamines and indomethacin. J Invest Dermatol 76: 322 (abstr)
21. Cronin E (1980) Contact dermatitis. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, New York
22. Daniels F (1961) Plastic Materials for ultraviolet protection. Archives of Dermatology 84: 392-395
23. Daniels F (1965) A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds. J Invest Dermatol 44: 259-263
24. Dawson B, Follenfant RL, Higgs GA, Schneider C, Gibson JR (1985) The effect of BW 540 C, a novel anti-inflammatory agent, on ultraviolet-induced physical and histological changes in guinea pig skin. Br J Dermatol 113, Suppl 28: 137-140
25. Diffey BL, Brown S (1983) A method for predicting the phototoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. Br J Clin Pharmacol 16: 633-638
26. Eaglstein WH, Ginsberg LD, Mertz PM (1979) Ultraviolet irradiation-induced inflammation. Arch Dermatol 115: 1421-1423
27. Edwards EK, Horwitz SN, Frost P (1982) Reduction of the erythema response to ultraviolet light by nonsteroidal antiinflammatory agents. Arch Dermatol Res 272: 263-267

28. Emmett EA (1979) Phototoxicity from exogenous agents. *Photochem Photobiol* 30: 429-436
29. Epstein JH (1982) Chemical phototoxicity in humans. *J Nat Canc Inst* 69: 265-268
30. Epstein JH (1983) Phototoxicity and photoallergy in man. *J Am Acad Dermatol* 8: 141-147
31. Epstein S (1939) Photoallergy and primary photosensitivity to sulfanilamide. *J Invest Dermatol* 2: 43-51
32. Fenton DA, Wilkinson JD, English JS (1981) Photosensitisation to benoxaprofen not due to ultraviolet A alone. *Lancet* II: 1230-1231
33. Ferguson J, Addo JA, McGill PE, Woodcock KR, Johnson BE, Frain-Bell W (1982) A study of benoxaprofen-induced photosensitivity. *Br J Dermatol* 107: 429-442
34. Fjellner B (1983) Photosensitivity induced by piroxicam. *Acta Derm Venerol (Stockh.)* 63: 557-558
35. Freeman RG (1970) Interaction of phototoxic compounds with cells in tissue culture. *Arch Dermatol* 102: 521-526
36. Freeman RG, Murtishaw W, Knox JM (1970) Tissue culture techniques in the study of cell photobiology and phototoxicity. *J Invest Dermatol* 54: 164-169
37. Galosi A, Przybilla B, Ring J, Dorn M (1984) Systemische Photoprovokation mit Surgam. *Allergologie* 7: 143-144 (Abstr)

38. Galosi A, Przybilla B, Ring J, Dorn M (1984)  
Photosensitizing potential of the nonsteroidal  
antiinflammatory drug (NSAID) tiaprofenic acid  
(TPA). *J Allergy Clin Immunol* 73: 165 (Abstr)
39. Geißler B, Lischka G (1984) Lichtsensibilisierung  
durch Carprofen. *Akt Dermatol* 10: 185-187
40. Greaves MW, Hensby CN, Plummer NA, Warin AP (1978)  
The effect of combined ultraviolet A irradiation  
and oral psoralens (PUVA) on skin arachidonic  
acid and prostaglandin concentrations in psoria-  
sis. *J Invest Dermatol* 71: 277-279
41. Greenberg RA, Eaglstein WH, Turnier H, Houdek PV  
(1975) Orally given indomethacin and blood flow  
response to UVL. *Arch Dermatol* 111: 328-330
42. Greist MC, Ozols II, Ridolfo AS, Muus JC (1982)  
The phototoxic effects of benoxaprofen and their  
management and prevention. *Eur J Rheumatol Inflamm*  
5: 138-147
43. Grigoriu D, Delacrétaz J, Borelli D (1984) Lehr-  
buch der medizinischen Mykologie. Verlag Hans  
Huber, Bern
44. Gschnait F, Pehamberger H (1977) Indomethacin  
does not affect PUVA induced erythema. *Arch*  
*Dermatol Res* 259: 109-111
45. Haley LD (1973) Laboratory methods in medical  
mycology. US Department of Health, Education and  
Welfare, Public Health Service
46. Halsey P, Cardoe N (1982) Benoxaprofen: side  
-effect profile in 300 patients. *Brit Med J* 284:  
1365-1368

47. Hasan T, Kochevar IE, McAuliffe DJ, Cooperman BS, Abdulah D (1984) Mechanism of tetracycline phototoxicity. *J Invest Dermatol* 83: 179-183
48. Hawk JLM (1984) Photosensitizing agents used in the United Kingdom. *Clin Exper Dermatol* 9: 300-302
49. Hawker LE, Linton AH, Folkes BF, Carlile MJ (1979) Einführung in die Biologie der Mikroorganismen. University of Bristol, Georg Thieme Verlag Stuttgart
50. Hindson C, Daymond T, Diffey B, Lawlor F (1982) Side effects of benoxaprofen. *Brit Med J* 284: 1368-1369
51. Horio T (1981) Evaluation of drug phototoxicity by photosensitization of Trichophyton mentagrophytes. *Br J Dermatol* 105: 365-370
52. Hoting E, Schulz KH (1984) Photoallergische Reaktionen auf Carprofen. *Dermatosen* 32: 215-216
53. Ippen H (1970) Einfache in vitro-Untersuchungen zur photodynamischen und photoallergischen Reaktion. *Arch klin exp Derm* 237: 499
54. Ippen H (1978) Pathologische Lichtreaktionen der Haut. Diagnose und Therapie in der ärztlichen Praxis. *Med Klin* 73: 1299-1309
55. Ison A, Blank H (1976) Testing drug phototoxicity in mice. *J Invest Dermatol* 49: 508-511
56. Ison A, Davis CM (1969) Phototoxicity of quinoline methynols and other drugs in mice and yeast. *J Invest Dermatol* 52: 193-198
57. Jung EG, Hoppe U (1976) Phototoxische Testung an menschlicher Haut. In: Jung EG, Photochemotherapie Mannheim, Schattauer Verlag: 55-59

58. Jungermann K, Möhler H (1980) Biochemie; Ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, Biologie und Pharmazie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
59. Kaidbey KH, Kligman AM (1978) Identification of topical photosensitizing agents in humans. J Invest Dermatol 70: 149-151
60. Kietzmann H, Rüther TH, Scheuer B (1984) Photosensitive Hautreaktionen auf Carprofen. Akt Dermatol 10: 17-20
61. Kindl G, Raab W (1983) Licht und Haut. Bräunung, Lichtschutz, Pflege. Ein Leitfaden. Govi, Frankfurt
62. Kligman AM, Breit R (1968) The identification of phototoxic drugs by human assay. J Invest Dermatol 51: 90-99
63. Kligman AM, Kaidbey KH (1982) Phototoxicity to benoxaprofen. Eur J Rheumatol Inflamm 5: 124-137
64. Knudsen EA (1980) In vitro studies on the antifungal effect of PUVA. Acta Dermatovener 60: 452-456
65. Kobayashi F, Wada Y, Mizuno N (1974) Comparative studies on phototoxicity of chemicals. J Dermatol 1: 93-98 (Japan)
66. Kochevar IE (1983) Basic concepts in photobiology. In: Parrish JA, Kripke ML, Morison WL (ed) Photoimmunology 5-21 Plenum New York, London .
67. Kraemer KH, Waters HL, Cohen LF, Popescu NC, Ambaugh SC, DiPaolo JA, Glaubiger D, Ellingson OL, Tarone RE (1981) Effects of 8-Methoxypsoralen and ultraviolet radiation on human lymphoid cells in vitro. J Invest Dermatol 76: 80-87

68. Krüger JP, Christophers E, Schlaak M (1978) Dose-effects of 8-Methoxypsoralen and UVA in cultured human lymphocytes. *Br J Dermatol* 98: 141-144
69. Lischka G, Jung EG (1978) Lichtkrankheiten der Haut. Beiträge zur Dermatologie, Band 4. Perimed-Verlag Dr. med. Straube, Erlangen
70. Ljunggren B (1985) Propionic acid-derived non-steroidal antiinflammatory drugs are phototoxic in vitro. *Photodermatology* 2: 3-9
71. Ljunggren B, Bjellerup M, Möller H (1983) Experimental studies on the mechanism of benoxaprofen photoreactions. *Arch Dermatol Res* 275: 318-323
72. Magnus IA (1976) Dermatological photobiology. Clinical and experimental aspects. Blackwell, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne
73. Martin VM (1982) Side effects of benoxaprofen. *Brit Med J* 285: 61-62
74. Maurer T, Weirich EG, Hess R (1980) Photokontaktallergie. Zur Epidemiologie und prädiktiven tierexperimentellen Erfassung. *Dermatosen* 28: 70-81
75. McCormack LS, Elgart ML, Turner ML (1982) Benoxaprofen-induced photo-onycholysis. *J Am Acad Dermatol* 7: 678-680
76. Melski JW, Tanenbaum L, Parrish JA, Fitzpatrick TB, Bleich HL (1977) Oral Methoxalen photochemotherapy for the treatment of psoriasis: a cooperative clinical trial. *J Invest Dermatol* 68: 328-335
77. Merot Y, Harms M, Saurat JH (1983) Photosensibilisation au carprofène (Imadyl<sup>R</sup>), un nouvel anti-inflammatoire non stéroïdien. *Dermatologica* 166: 301-307

78. Miller WS, Ruderman FR, Smith JG (1976) Aspirin and ultraviolet light-induced erythema in man. Arch Dermatol 95: 357-358
79. Morison WL, Kochevar IE (1983) Photoallergy. In: Parrish JA, Kripke ML, Morison WL (ed) Photo-immunology 227-253 Plenum, New York, London
80. Morison WL, McAuliffe DJ, Parrish JA, Bloch KJ (1982) In vitro assay for phototoxic chemicals. J Invest Dermatol 78: 460-463
81. Muller R, Mitchell JC (1971) Psoralen-type photo-toxicity of Tetramethyl-Thiuram-Monosulfide for Candida albicans. J Invest Dermatol 56: 340
82. Mutzhas MF, Hölzle E, Hofmann C, Plewig G (1981) A new apparatus with high radiation energy between 320-460 nm: Physical description and dermatological applications. J Invest Dermatol 76: 42-47
83. Oberste-Lehn H, Plempel M (1977) Zur Wirkung von 8-Methoxypsoralen (8-MOP) und Blacklight auf Mikro-organismen in vitro und den Ablauf der experimen-tellen Meerschweinchen-Trichophytie. Dermatologica 154: 193-202
84. Oberzill W (1967) Mikrobiologische Analytik. Verlag Hans Carl, Nürnberg
85. Ohno M, Hadame K, Mizuno N (1982) Clinical and experimental studies on carprofen (CRF) photo-sensitivity. In: Abstracts XVI. Congressus Inter-nationalis Dermatologiae Tokyo, May 23-28, 1982, 230. University of Tokyo Press

86. Okamoto H, Takigawa M, Horio T (1985) Alteration of lymphocyte functions by 8-Methoxypsoralen and longwave ultraviolet radiation I. Suppressive effects of PUVA on T-lymphocyte migration in vitro. *J Invest Dermatol* 84: 203-205
87. Otis B, Field G, Jillson A (1981) Testing for phototoxicity and photoallergy. In: Urbach F; The biologic effects of ultraviolet radiation. Pergamon Press: 533
88. Pathak MA, (1982) Molecular aspects of drug photosensitivity with special emphasis on psoralen photosensitization reaction. *J Nat Canc Inst* 69: 163-170
89. Plewig G, Hölzle E, Roser-Maaß E, Hofmann C (1981) Photoallergy. In: Ring J, Burg G (ed) New trends in allergy 152-169 Springer, Berlin, Heidelberg, New York
90. Przybilla B, Brunner R, Ring J, Galosi A, Dorn M (1984) Lichtinduziertes Arzneiexanthem. Auslösung durch Carprofen. *Münch Med Wschr* 126: 1503-1506
91. Przybilla B, Dorn M (1984) Photosensibilisierung durch nichtsteroidale Antirheumatika. *Hautarzt* 35: 561-562
92. Przybilla B, Ring J, Galosi A, Dorn M (1984) Patch test reactions to tiaprofenic acid. *Contact Dermatitis* 10: 55-56
93. Przybilla B, Ring J, Schwab U, Dorn M (1986) Nichtsteroidale Antirheumatika mit photosensibilisierender Wirkung. *Allergologie* 9: 8-15

94. Przybilla B, Ring J, Schwab U, Galosi A, Dorn M (1987) Photosensibilisierende Eigenschaften nicht-steroidaler Antirheumatika im Photopatch-Test. *Hautarzt* 38: 18-25
95. Rebell G, Taplin D (1970) *Dermatophytes, their recognition and identification*. University of Miami Press, Coral Gables, Florida: 115
96. Rij K (1984) *The yeasts - a taxonomic study*. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam
97. Römpfs Chemie-Lexikon (1972) Franckh, Stuttgart: 498
98. Ruzicka T, Printz MP (1984) Arachidonic acid metabolism in skin: a review. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 100: 121-160
99. Sams WM (1966) The experimental production of drug phototoxicity in guinea pigs. *Arch Dermatol* 94: 773-777
100. Sams WM, Epstein JH (1967) The experimental production of drug phototoxicity in guinea pigs. *J Invest Dermatol* 48: 89-94
101. Scherwitz C, Rassner G, Martin R (1978) Effects of 8-Methoxypsoralen plus 365 nm UVA light on *Candida albicans* cells. An electron microscopic study. *Arch Dermatol Res* 263: 47-58
102. Schulze-Dirks A (1985) Photosensibilisierung durch Imadyl (Carprofen). *Hautarzt* 36: 366-367
103. Schwab U, Przybilla B, Ring J, Galosi A, Dorn M (1985) In vitro evaluation of the phototoxic action of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) with photohaemolysis test (PHT) and photo-basophil-histamine-release test (PBHRT). *Arch Dermatol Res* 277: 427-428

104. Serrano G, Bonillo J, Aliaga N, Gargallo E, Pelufo C (1984) Piroxicam-induced photosensitivity. In vivo and in vitro studies of its photosensitizing potential. J Am Acad Dermatol 11: 113-120
105. Snyder DS (1976) Effect of topical indomethacin on UVR-induced redness and prostaglandin E levels in sunburned guinea pig skin. Prostaglandins 11: 631-643
106. Snyder DS, Eaglstein WH (1974) Intradermal anti-prostaglandin agents and sunburn. J Invest Dermatol 62: 47-50
107. Stern RS, Sachs R (1983) Phototoxic reactions to Piroxicam and other nonsteroidal antiinflammatory agents (Letter). N Engl J Med 309: 186-187
108. Stott CW, Stasse J, Bonomo R, Campbell AH (1970) Evaluation of the phototoxic potential of topically applied agents using long-wave ultraviolet light. J Invest Dermatol 55: 335-338
109. Tronnier H (1978) Zur Praxis der Verträglichkeitsprüfungen und der Testung auf Lichtsensibilisierung beim Menschen. Ärztl Kosmetol 8: 216-218
110. Verhagen AR, Bergers M, Jongh G, Mier PD (1983) Effects of PUVA on human blood monocytes in vitro. J Invest Dermatol 81: 201-203
111. Wiesmann E (1978) Medizinische Mikrobiologie, eine Einführung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
112. Willis J, Kligman AM (1968) Diagnosis of photosensitization reactions by the Scotch Tape<sup>R</sup> provocative patch test. J Invest Dermatol 51: 116-119

113. Winner HJ, Hurley R (1964) *Candida albicans*.  
London, Churchill.
114. Wiskemann A (1976) Phototoxizitäts-Bestimmungen  
an *Paramecium* und *Candida albicans*. In: Jung  
EG. Photochemotherapie. Schattauer Verlag, Mann-  
heim: 49-53
115. Wiskemann A (1981) Photosensibilisierung durch  
Benoxapofen. *Arzneim.-Forsch./Drug Res* 31:  
730-732
116. Wulf HC (1982) Aspects of the toxicology of  
8-Methoxypsoralen and longwave ultraviolet light.  
*Akt Dermatol, Suppl* 106: 1-42
117. Ziboh VA, Lord JT, Uematsu S, Blick G (1978)  
Activation of phospholipase  $A_2$  and increased re-  
lease of prostaglandin precursor from skin by  
ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol* 70:  
211-224

## 8. DATENANHANG

### Zählergebnisse (100 Zellen/ml): 5 Ansätze mit Carprofen ( $10^{-3}M$ ) und UV-A-Bestrahlung

| <u>0 J/cm<sup>2</sup>:</u> | 2 h | 22,5 h | 30,5 h | 45,5 h | 72 h   |
|----------------------------|-----|--------|--------|--------|--------|
| LW                         | 242 | 328032 | 342504 | 342906 | 364212 |
| CPF                        | 352 | 329238 | 328434 | 331248 | 354162 |
| CPF                        | 352 | 308334 | 312354 | 291852 | 327630 |
| CPF                        | 308 | 339288 | 342504 | 340896 | 367428 |
| CPF                        | 330 | 338484 | 345720 | 333258 | 354162 |
| CPF                        | 330 | 311952 | 316776 | 292556 | 343710 |

| <u>1 J/cm<sup>2</sup>:</u> |     |        |        |        |        |
|----------------------------|-----|--------|--------|--------|--------|
| LW                         | 242 | 334264 | 346324 | 347078 | 360846 |
| CPF                        | 330 | 351750 | 358986 | 343710 | 365016 |
| CPF                        | 286 | 352956 | 355368 | 339690 | 361398 |
| CPF                        | 242 | 352956 | 349338 | 332454 | 336826 |
| CPF                        | 264 | 322806 | 321198 | 316776 | 337278 |
| CPF                        | 242 | 350946 | 350946 | 347730 | 368684 |

| <u>5 J/cm<sup>2</sup>:</u> |     |        |        |        |        |
|----------------------------|-----|--------|--------|--------|--------|
| LW                         | 264 | 352956 | 358132 | 350142 | 361800 |
| CPF                        | 176 | 71556  | 261702 | 256476 | 292254 |
| CPF                        | 176 | 49848  | 239592 | 272556 | 279792 |
| CPF                        | 132 | 45426  | 235974 | 266526 | 293862 |
| CPF                        | 198 | 49044  | 239190 | 294666 | 305520 |
| CPF                        | 154 | 37788  | 231552 | 293862 | 300294 |

| <u>25 J/cm<sup>2</sup>:</u> |     |        |        |        |        |
|-----------------------------|-----|--------|--------|--------|--------|
| LW                          | 220 | 309590 | 317530 | 325620 | 351298 |
| CPF                         | 154 | 220    | 3838   | 329238 | 339288 |
| CPF                         | 110 | 220    | 6060   | 308736 | 329238 |
| CPF                         | 132 | 198    | 5454   | 307128 | 319590 |
| CPF                         | 110 | 198    | 4242   | 334464 | 331348 |
| CPF                         | 154 | 176    | 16362  | 315570 | 319540 |

Zählergebnisse (100 Zellen/ml): 8-Methoxypsoralen  
(8-MOP) und Schwarzlicht

| <u>0 J/cm<sup>2</sup>:</u>    | 2 h | 20 h   | 28,5 h | 44 h   | 72,5 h |
|-------------------------------|-----|--------|--------|--------|--------|
| LW                            | 198 | 206628 | 246828 | 268938 | 264918 |
| 8-MOP 10 <sup>-3</sup>        | 154 | 186930 | 247230 | 274968 | 272958 |
| LW                            | 198 | 304716 | 336474 | 354564 | 349338 |
| 8-MOP 10 <sup>-4</sup>        | 132 | 259290 | 305118 | 326022 | 316776 |
| LW                            | 176 | 293862 | 323208 | 348534 | 341298 |
| 8-MOP 5 · 10 <sup>-6</sup>    | 198 | 236376 | 300294 | 319590 | 317580 |
| <u>0,25 J/cm<sup>2</sup>:</u> |     |        |        |        |        |
| LW                            | 154 | 253662 | 283008 | 303912 | 305520 |
| 8-MOP 10 <sup>-3</sup>        | 154 | 103314 | 207030 | 213864 | 214668 |
| LW                            | 154 | 258888 | 297480 | 324414 | 324816 |
| 8-MOP 10 <sup>-4</sup>        | 110 | 133062 | 265722 | 290646 | 287028 |
| LW                            | 176 | 266526 | 306324 | 319590 | 320394 |
| 8-MOP 5 · 10 <sup>-6</sup>    | 176 | 259290 | 331248 | 334062 | 332454 |
| <u>0,5 J/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |
| LW                            | 198 | 276978 | 298284 | 313560 | 319590 |
| 8-MOP 10 <sup>-3</sup>        | 176 | 108138 | 214668 | 219492 | 218286 |
| LW                            | 154 | 308334 | 334464 | 344112 | 344112 |
| 8-MOP 10 <sup>-4</sup>        | 132 | 135072 | 277782 | 264918 | 262506 |
| LW                            | 154 | 300294 | 332454 | 340896 | 338484 |
| 8-MOP 5 · 10 <sup>-6</sup>    | 132 | 215472 | 303510 | 320394 | 322404 |
| <u>1 J/cm<sup>2</sup>:</u>    |     |        |        |        |        |
| LW                            | 220 | 244014 | 270948 | 290646 | 282204 |
| 8-MOP 10 <sup>-3</sup>        | 154 | 100902 | 215070 | 221904 | 202206 |
| LW                            | 132 | 220296 | 307128 | 326022 | 314766 |
| 8-MOP 10 <sup>-4</sup>        | 154 | 129846 | 267330 | 288636 | 277782 |
| LW                            | 110 | 264516 | 312354 | 319590 | 318786 |
| 8-MOP 5 · 10 <sup>-6</sup>    | 132 | 155574 | 289038 | 301098 | 292656 |
| <u>1,5 J/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |
| LW                            | 154 | 260094 | 293460 | 279390 | 279792 |
| 8-MOP 10 <sup>-3</sup>        | 132 | 104520 | 211854 | 242808 | 234366 |
| LW                            | 154 | 221100 | 303912 | 308334 | 299892 |
| 8-MOP 10 <sup>-4</sup>        | 132 | 132660 | 260094 | 287832 | 279792 |
| LW                            | 154 | 321600 | 325620 | 326826 | 316374 |
| 8-MOP 5 · 10 <sup>-6</sup>    | 154 | 135876 | 260094 | 264918 | 263310 |
| <u>2 J/cm<sup>2</sup>:</u>    |     |        |        |        |        |
| LW                            | 132 | 208638 | 251250 | 272154 | 268134 |
| 8-MOP 10 <sup>-3</sup>        | 150 | 105726 | 219492 | 254868 | 247230 |
| LW                            | 154 | 298284 | 331248 | 334464 | 336876 |
| 8-MOP 10 <sup>-4</sup>        | 132 | 131454 | 268134 | 263310 | 251250 |
| LW                            | 154 | 270546 | 302706 | 324816 | 316776 |
| 8-MOP 5 · 10 <sup>-6</sup>    | 286 | 138690 | 278184 | 293862 | 281400 |

Zählergebnisse (100 Zellen/ml): 8-Methoxypsoralen  
(8-MOP) und Schwarzlicht

| <u>0 J/cm<sup>2</sup>:</u>  | 1 h | 19 h   | 27,5 h | 43 h   | 51 h   |
|-----------------------------|-----|--------|--------|--------|--------|
| LW                          | 242 | 292254 | 318786 | 307128 | 322404 |
| 8-MOP 10 <sup>-3</sup>      | 132 | 229542 | 289038 | 283410 | 311550 |
| LW                          | 110 | 298888 | 330846 | 295872 | 316776 |
| 8-MOP 5 · 10 <sup>-6</sup>  | 88  | 153966 | 292656 | 299892 | 321600 |
| <u>5 J/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |
| LW                          | 110 | 172056 | 264114 | 265320 | 294264 |
| 8-MOP 10 <sup>-3</sup>      | 132 | 13668  | 110952 | 178488 | 183714 |
| LW                          | 154 | 233946 | 303510 | 300696 | 326424 |
| 8-MOP 5 · 10 <sup>-6</sup>  | 154 | 83214  | 287028 | 283008 | 306324 |
| <u>10 J/cm<sup>2</sup>:</u> |     |        |        |        |        |
| LW                          | 154 | 67134  | 231954 | 285170 | 264466 |
| 8-MOP 10 <sup>-3</sup>      | 154 | 18894  | 126000 | 194568 | 213462 |
| LW                          | 198 | 249240 | 321198 | 322404 | 336072 |
| 8-MOP 5 · 10 <sup>-6</sup>  | 110 | 20904  | 205824 | 253662 | 264918 |

Zählergebnisse (100 Zellen/ml): 8-Methoxypsoralen  
(8-MOP,  $10^{-3}M$ ) und UV-A-Bestrahlung

| <u>0 J/cm<sup>2</sup>:</u>                     | 1 h | 19 h   | 27 h   | 43 h   | 51 h   | 68 h   |
|------------------------------------------------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|
| LW                                             | 286 | 293460 | 309942 | 305118 | 308340 |        |
| 8-MOP                                          | 198 | 234366 | 292656 | 295872 | 321198 |        |
| <u>1 J/cm<sup>2</sup>:</u>                     |     |        |        |        |        |        |
| LW                                             | 154 | 248838 | 299088 | 322404 | 321980 |        |
| 8-MOP                                          | 176 | 5252   | 71958  | 177282 |        | 167986 |
| <u>5 J/cm<sup>2</sup>:</u>                     |     |        |        |        |        |        |
| LW                                             | 220 | 289038 | 317982 | 326424 |        |        |
| 8-MOP                                          | 154 | 5050   | 69144  | 182106 |        | 166378 |
| <u>25 J/cm<sup>2</sup>:</u>                    |     |        |        |        |        |        |
| LW                                             | 132 | 124444 | 259898 | 293764 |        | 280498 |
| 8-MOP                                          | 110 | 3434   | 45024  | 195777 |        | 170448 |
| <u>50 J/cm<sup>2</sup>:</u>                    |     |        |        |        |        |        |
| LW                                             | 176 | 89244  | 243612 | 256878 | 265320 |        |
| 8-MOP                                          | 132 | 11658  | 97686  | 169644 | 174066 |        |
| <u>100 J/cm<sup>2</sup>:</u>                   |     |        |        |        |        |        |
| LW                                             | 132 | 9648   | 180498 | 202608 | 215362 |        |
| 8-MOP                                          | 110 | 13266  | 107736 | 182508 | 184216 |        |
| <u>25 J/cm<sup>2</sup>, Einwirkzeit: 2,5 h</u> |     |        |        |        |        |        |
| LW                                             | 132 | 9090   | 121002 | 273910 | 282410 |        |
| 8-MOP                                          | 176 | 132    | 154    | 110    | 132    |        |

Zählergebnisse (100 Zellen/ml): 8-Methoxypsoralen  
(8-MOP,  $10^{-3}M$ ) und UV-B-Bestrahlung

| <u>0 J/cm<sup>2</sup>:</u>     | 1 h | 17 h   | 27 h   | 42 h   | 66 h   | 89 h   |
|--------------------------------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|
| LW                             | 220 | 313560 | 316374 | 328434 | 323220 | 274566 |
| 8-MOP                          | 220 | 280596 | 335770 | 321198 |        | 264918 |
| <u>100 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |        |
| LW                             | 132 | 8080   | 189744 | 302706 | 308762 | 301098 |
| 8-MOP                          | 198 | 13332  | 215070 | 266526 |        | 233964 |
| <u>500 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |        |
| LW                             | 88  | 110    | 6464   | 282000 | 286224 | 276878 |
| 8-MOP                          | 88  | 88     | 264    | 10340  | 45024  | 49446  |
| <u>1000 mJ/cm<sup>2</sup>:</u> |     |        |        |        |        |        |
| LW                             | 88  | 110    | 1836   | 282606 | 283862 | 254466 |
| 8-MOP                          | 110 | 88     | 154    | 1892   | 9246   | 6834   |

Zählergebnisse (100 Zellen/ml): Benoxaprofen  
(BXP,  $10^{-3}M$ ) und UV-A-Bestrahlung

| <u>0 J/cm<sup>2</sup>:</u>   | 1 h | 19 h   | 27 h   | 43 h   | 51 h   |
|------------------------------|-----|--------|--------|--------|--------|
| LW                           | 132 | 229542 | 311952 | 326826 | 328434 |
| BXP                          | 88  | 187734 | 307128 | 299892 | 311952 |
| BXP                          | 176 | 255270 | 301902 | 299892 | 306830 |
| <u>1 J/cm<sup>2</sup>:</u>   |     |        |        |        |        |
| LW                           | 176 | 264516 | 322806 | 319590 |        |
| BXP                          | 176 | 275822 | 310746 | 324062 |        |
| <u>5 J/cm<sup>2</sup>:</u>   |     |        |        |        |        |
| LW                           | 110 | 260496 | 323208 | 323258 |        |
| BXP                          | 88  | 207432 | 287832 | 290646 |        |
| <u>25 J/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |
| LW                           | 110 | 259038 | 329238 | 320142 |        |
| BXP                          | 154 | 209040 | 279792 | 277330 |        |
| <u>50 J/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |
| LW                           | 132 | 265320 | 322404 | 324414 | 325270 |
| BXP                          | 154 | 57486  | 265722 | 265320 | 274566 |
| <u>100 J/cm<sup>2</sup>:</u> |     |        |        |        |        |
| LW                           | 132 | 31356  | 262908 | 276978 | 280204 |
| BXP                          | 66  | 3030   | 43416  | 180900 | 186730 |

Zählergebnisse (100 Zellen/ml): Benoxaprofen  
(BXP,  $10^{-3}M$ ) und UV-B-Bestrahlung

| <u>0 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>    | 1 h | 17 h   | 27 h   | 42 h   | 66 h   |
|--------------------------------|-----|--------|--------|--------|--------|
| LW                             | 110 | 218688 | 310344 | 313208 | 314280 |
| BXP                            | 110 | 188940 | 280596 | 296224 | 302000 |
| <u>100 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |
| LW                             | 176 | 13332  | 216526 | 298284 | 285822 |
| BXP                            | 110 | 122610 | 248436 | 243612 | 242004 |
| <u>500 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |
| LW                             | 66  | 154    | 14520  | 278184 | 272556 |
| BXP                            | 88  | 3636   | 113766 | 210648 | 205020 |
| <u>1000 mJ/cm<sup>2</sup>:</u> |     |        |        |        |        |
| LW                             | 110 | 110    | 6030   | 260320 | 254114 |
| BXP                            | 66  | 10100  | 183312 | 225120 | 194568 |

Zählergebnisse (100 Zellen/ml): Carprofen (CPF,  $10^{-3}M$ )  
und UV-A-Bestrahlung

|                              |     | 0,5 h | 7 h    | 19 h   | 30 h   | 43 h   | 54 h   | 74 h |
|------------------------------|-----|-------|--------|--------|--------|--------|--------|------|
| <u>0 J/cm<sup>2</sup>:</u>   |     |       |        |        |        |        |        |      |
| LW                           | 242 | 6182  | 338750 | 343804 | 346892 | 343820 |        |      |
| CPF                          | 330 | 6116  | 351750 | 340732 | 355180 | 358792 | 353782 |      |
| <u>5 J/cm<sup>2</sup>:</u>   |     |       |        |        |        |        |        |      |
| LW                           | 242 | 6210  | 331242 | 323720 | 346782 | 348684 |        |      |
| CPF                          | 264 | 5220  | 207352 | 264284 | 267348 | 278830 | 277020 |      |
| <u>25 J/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |       |        |        |        |        |        |      |
| LW                           | 352 | 4980  | 312354 | 323178 | 347846 | 335970 | 343748 |      |
| CPF                          | 176 | 308   | 1056   | 273910 | 302806 | 305448 | 300498 |      |
| <u>50 J/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |       |        |        |        |        |        |      |
| LW                           | 308 | 4456  | 304888 | 322070 | 313760 | 325852 | 314320 |      |
| CPF                          | 220 | 264   | 242    | 242    | 286    | 242    | 242    |      |
| <u>100 J/cm<sup>2</sup>:</u> |     |       |        |        |        |        |        |      |
| LW                           | 242 | 7680  | 52250  | 285862 | 299194 | 280532 |        |      |
| CPF                          | 110 | 132   | 242    | 81204  | 220934 | 240798 | 234480 |      |

Zählergebnisse (100 Zellen/ml): Carprofen (CPF,  $10^{-3}M$ )  
und UV-B-Bestrahlung

|                                |     | 1 h  | 8 h    | 22 h   | 32 h   | 61 h |
|--------------------------------|-----|------|--------|--------|--------|------|
| <u>0 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>    |     |      |        |        |        |      |
| LW                             | 242 | 4040 | 262104 | 287230 | 284324 |      |
| CPF                            | 308 | 4242 | 265320 | 279886 | 280220 |      |
| <u>100 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |      |        |        |        |      |
| LW                             | 242 | 286  | 240798 | 250696 | 268782 |      |
| CPF                            | 264 | 594  | 151152 | 195372 | 203310 |      |
| <u>500 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |      |        |        |        |      |
| LW                             | 220 | 264  | 38684  | 245228 | 256864 |      |
| CPF                            | 220 | 110  | 14070  | 145926 | 134280 |      |
| <u>1000 mJ/cm<sup>2</sup>:</u> |     |      |        |        |        |      |
| LW                             | 154 | 154  | 4708   | 256576 | 254334 |      |
| CPF                            | 154 | 110  | 34140  | 186528 | 223078 |      |

Zählergebnisse (100 Zellen/ml): Diclofenac-Na  
(DCF,  $10^{-3}M$ ) und UV-A-Bestrahlung

| <u>0 J/cm<sup>2</sup>:</u>   | 1 h | 19 h   | 27 h   | 43 h   | 51 h   |
|------------------------------|-----|--------|--------|--------|--------|
| LW                           | 110 | 229944 | 292254 | 303510 | 308736 |
| DCF                          | 132 | 245220 | 302304 | 301752 | 304214 |
| <u>1 J/cm<sup>2</sup>:</u>   |     |        |        |        |        |
| LW                           | 132 | 299088 | 324414 | 322806 |        |
| DCF                          | 198 | 278184 | 311550 | 299892 |        |
| <u>5 J/cm<sup>2</sup>:</u>   |     |        |        |        |        |
| LW                           | 132 | 290646 | 326022 | 316726 |        |
| DCF                          | 176 | 293460 | 311550 | 310746 |        |
| <u>25 J/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |
| LW                           | 110 | 288134 | 301902 | 294264 |        |
| DCF                          | 176 | 292656 | 315570 | 302304 |        |
| <u>50 J/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |
| LW                           | 132 | 268788 | 317982 | 303912 |        |
| DCF                          | 154 | 1414   | 245724 | 255672 |        |
| <u>100 J/cm<sup>2</sup>:</u> |     |        |        |        |        |
| LW                           | 154 | 236582 | 275370 | 287028 | 274882 |
| DCF                          | 132 | 12060  | 169242 | 228336 | 227532 |

Zählergebnisse (100 Zellen/ml): Diclofenac-Na  
(DCF,  $10^{-3}M$ ) und UV-B-Bestrahlung

| <u>0 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>    | 1 h | 17 h   | 27 h   | 42 h   | 66 h   | 90 h   |
|--------------------------------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|
| LW                             | 220 | 303562 | 312440 | 323458 |        |        |
| DCF                            | 110 | 262006 | 288754 | 309242 |        |        |
| <u>100 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |        |
| LW                             | 132 | 160060 | 199340 | 301284 |        |        |
| DCF                            | 176 | 203814 | 248738 | 250372 |        |        |
| <u>500 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |        |
| LW                             | 66  | 154    | 8488   | 287330 | 282614 | 267330 |
| DCF                            | 110 | 606    | 1212   | 2376   | 93666  | 88038  |
| <u>1000 mJ/cm<sup>2</sup>:</u> |     |        |        |        |        |        |
| LW                             | 110 | 88     | 754    | 273836 | 266688 | 242808 |
| DCF                            | 88  | 66     | 154    | 176    | 154    | 132    |

Zählergebnisse (100 Zellen/ml): Ketoprofen (KPF,  $10^{-3}M$ )

und UV-A-Bestrahlung

| <u>0 J/cm<sup>2</sup>:</u>   | 0,5h | 7 h  | 19 h   | 30 h   | 43 h   | 54 h   |
|------------------------------|------|------|--------|--------|--------|--------|
| LW                           | 242  | 5214 | 340092 | 347956 | 359394 | 364812 |
| KPF                          | 242  | 6182 | 333660 | 336518 | 365414 | 351568 |
| <u>5 J/cm<sup>2</sup>:</u>   |      |      |        |        |        |        |
| LW                           | 352  | 7370 | 336474 | 323274 | 347956 | 349160 |
| KPF                          | 198  | 242  | 238286 | 293144 | 316050 | 310632 |
| <u>25 J/cm<sup>2</sup>:</u>  |      |      |        |        |        |        |
| LW                           | 352  | 5126 | 324414 | 310030 | 336518 | 326886 |
| KPF                          | 198  | 176  | 220    | 37386  | 282338 | 300398 |
| <u>50 J/cm<sup>2</sup>:</u>  |      |      |        |        |        |        |
| LW                           | 308  | 3740 | 313560 | 302806 | 326284 | 326284 |
| KPF                          | 176  | 110  | 110    | 132    | 154    | 132    |
| <u>100 J/cm<sup>2</sup>:</u> |      |      |        |        |        |        |
| LW                           | 242  | 8080 | 31356  | 276978 | 282204 | 280606 |
| KPF                          | 132  | 110  | 110    | 132    | 88     | 110    |

Zählergebnisse (100 Zellen/ml): Ketoprofen (KPF,  $10^{-3}M$ )

und UV-B-Bestrahlung

| <u>0 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>    | 1 h | 8 h  | 22 h   | 32 h   | 44 h   |
|--------------------------------|-----|------|--------|--------|--------|
| LW                             | 110 | 4040 | 262104 | 323208 | 311572 |
| KPF                            | 198 | 2020 | 254868 | 292000 | 301370 |
| <u>100 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |      |        |        |        |
| LW                             | 176 | 594  | 243560 | 286832 | 288660 |
| KPF                            | 198 | 374  | 250446 | 260496 | 262532 |
| <u>500 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |      |        |        |        |
| LW                             | 66  | 154  | 8080   | 276218 | 274324 |
| KPF                            | 176 | 110  | 113766 | 290244 | 297826 |
| <u>1000 mJ/cm<sup>2</sup>:</u> |     |      |        |        |        |
| LW                             | 110 | 154  | 4708   | 276576 | 268992 |
| KPF                            | 154 | 132  | 27738  | 272556 | 274320 |

Zählergebnisse (100 Zellen/ml): Tiaprofensäure  
(TPA,  $10^{-3}M$ ) und UV-A-Bestrahlung

| <u>0 J/cm<sup>2</sup>:</u>   | 1 h | 19 h   | 27 h   | 43 h   | 51 h   |
|------------------------------|-----|--------|--------|--------|--------|
| LW                           | 132 | 229542 | 311952 | 326826 | 328434 |
| TPA                          | 154 | 294666 | 336876 | 334504 | 332068 |
| <u>1 J/cm<sup>2</sup>:</u>   |     |        |        |        |        |
| LW                           | 176 | 264516 | 322806 | 319590 |        |
| TPA                          | 154 | 116982 | 278184 | 281400 |        |
| <u>5 J/cm<sup>2</sup>:</u>   |     |        |        |        |        |
| LW                           | 110 | 260496 | 323208 | 323258 |        |
| TPA                          | 88  | 14544  | 201402 | 241602 | 232400 |
| <u>25 J/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |
| LW                           | 110 | 259038 | 329238 | 320142 |        |
| TPA                          | 88  | 4646   | 78390  | 165624 | 173430 |
| <u>50 J/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |
| LW                           | 132 | 265320 | 322404 | 324414 | 325270 |
| TPA                          | 132 | 220    | 154    | 176    | 88     |
| <u>100 J/cm<sup>2</sup>:</u> |     |        |        |        |        |
| LW                           | 132 | 31356  | 262908 | 276978 | 280204 |
| TPA                          | 154 | 198    | 154    | 110    | 110    |

Zählergebnisse (100 Zellen/ml): Tiaprofensäure  
(TPA,  $10^{-3}M$ ) und UV-B-Bestrahlung

| <u>0 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>    | 1 h | 8 h  | 22 h   | 32 h   | 45 h   |
|--------------------------------|-----|------|--------|--------|--------|
| LW                             | 110 | 4040 | 262104 | 313208 | 316420 |
| TPA                            | 198 | 1818 | 270044 | 299892 | 306332 |
| <u>100 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |      |        |        |        |
| LW                             | 176 | 594  | 243560 | 286832 | 288443 |
| TPA                            | 132 | 374  | 273360 | 270144 |        |
| <u>500 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |      |        |        |        |
| LW                             | 66  | 154  | 8080   | 276318 | 274320 |
| TPA                            | 176 | 220  | 233964 | 261300 | 258720 |
| <u>1000 mJ/cm<sup>2</sup>:</u> |     |      |        |        |        |
| LW                             | 110 | 154  | 4708   | 276576 | 273430 |
| TPA                            | 176 | 132  | 106530 | 234366 | 228862 |

Zählergebnisse (100 Zellen/ml): Demeclocyclin  
(DMC,  $10^{-3}M$ ) und UV-A-Bestrahlung

| <u>0 J/cm<sup>2</sup>:</u>   | 1 h | 19 h   | 27 h   | 43 h   | 51 h   |
|------------------------------|-----|--------|--------|--------|--------|
| LW                           | 110 | 229944 | 292254 | 303510 | 308736 |
| DMC                          | 176 | 245166 | 303912 | 296952 |        |
| <u>25 J/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |
| LW                           | 110 | 288134 | 301902 | 294264 |        |
| DMC                          | 374 | 311748 | 300062 | 291800 |        |
| <u>50 J/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |
| LW                           | 132 | 268788 | 317982 | 303912 |        |
| DMC                          | 220 | 275242 | 288754 | 294338 | 288062 |
| <u>100 J/cm<sup>2</sup>:</u> |     |        |        |        |        |
| LW                           | 154 | 236582 | 275370 | 287028 | 274882 |
| DMC                          | 132 | 18180  | 266072 | 288790 | 282862 |

Zählergebnisse (100 Zellen/ml): Demeclocyclin  
(DMC,  $10^{-3}M$ ) und UV-B-Bestrahlung

| <u>0 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>    | 1 h | 17 h   | 27 h   | 42 h   | 66 h   |
|--------------------------------|-----|--------|--------|--------|--------|
| LW                             | 132 | 303562 | 312440 | 323458 |        |
| DMC                            | 66  | 277440 | 307284 | 296884 |        |
| <u>100 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |
| LW                             | 132 | 154    | 199340 | 301284 | 298432 |
| DMC                            | 66  | 110    | 185420 | 300294 | 299304 |
| <u>200 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |
| LW                             | 110 | 154    | 177660 | 295420 | 299870 |
| DMC                            | 176 | 220    | 143832 | 255672 | 287870 |
| <u>500 mJ/cm<sup>2</sup>:</u>  |     |        |        |        |        |
| LW                             | 66  | 154    | 8488   | 287330 | 282614 |
| DMC                            | 176 | 220    | 6788   | 285420 | 286542 |
| <u>1000 mJ/cm<sup>2</sup>:</u> |     |        |        |        |        |
| LW                             | 110 | 88     | 754    | 273836 | 266688 |
| DMC                            | 154 | 2608   | 265320 | 305620 | 301952 |

## 9. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die ihren Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Dr. O. Braun-Falco für die Arbeitsmöglichkeit in der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München

Herrn Priv.-Doz. Dr. B. Przybilla für die Überlassung des Dissertationsthemas und die fortgesetzte Betreuung

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Ring und Herrn Priv.-Doz. Dr. H.-C. Korting in deren Labors die Versuche durchgeführt werden konnten

Frau Luxenburger, Frau Sedlmeier, Frau Reindl und Frau Fanderl für ihre wertvolle Hilfe

10. LEBENSLAUF

Name: Halbing

Vorname: Michael Andreas

Geburtsdatum: 12.02.61

Geburtsort: Lindau im Bodensee

Eltern: Dr. Heinrich Halbing, Zahnarzt  
Frieda Halbing, geb. Wichlajew

Schulbildung: 1967 - 1971 Grundschule Lindau Aeschach  
1971 - 1980 Bodenseegymnasium Lindau  
1980 Abitur

Studium: 1981 - 1986 Studium der Zahnheilkunde  
an der Ludwig-Maximilians-Universität  
München  
1983 zahnärztliche Vorprüfung  
1986 Staatsexamen

Approbation: 1986

Wehrdienst: 1986 - 1987 Stabsarzt der Zahnarzt-  
gruppe 608 im Sanitätszentrum Kempten

Eheschließung: Dezember 1986











